

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT ANTI-CANCÉREUX DES CATÉCHINES DU THÉ VERT ET  
D'UN NOUVEL AGENT ANTI-TUMORAL LE PCK3145  
SUR LA RÉGULATION DE LA MMP-9

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
JEAN-CHRISTOPHE CURRIE

JUILLET 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué, de quelque manière que se soit, à la réalisation de ce projet de maîtrise. Tout d'abord, je voudrais remercier particulièrement mon directeur de recherche, Dr Borhane Annabi, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour son aide inestimable au niveau scientifique, ses encouragements, son dynamisme et sa bonne humeur communicative. J'adresse mes sincères remerciements au Dr Richard Béliveau pour sa précieuse collaboration à la mise en œuvre de ce projet, pour ses bons conseils et pour sa passion scientifique contagieuse.

Je tiens également à remercier mes camarades du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et du Laboratoire de Médecine Moléculaire, plus particulièrement Mounia Bouzeghrane, Anissa Belkaid, Marie-Paule Lachambre, Nancy McLaughlin, Simon Fortier et Marie-Ève Rivard, pour leur amitié, leur support technique et moral ainsi que pour les bons moments passés en leur compagnie.

Je remercie la compagnie *Procyon BioPharma Inc.*, maintenant *Ambrilia BioPharma Inc.*, pour m'avoir permis de travailler sur leur peptide thérapeutique PCK3145.

J'adresse mes sincères remerciements à Anaë pour son amour inconditionnel qui me comble, ainsi qu'à ma famille et mes amis pour m'avoir toujours soutenu et encouragé dans mon cheminement professionnel autant que personnel.

J'aimerais finalement remercier la Faculté des Sciences de l'Université du Québec à Montréal pour l'attribution d'une bourse d'excellence.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGNES ET ACRONYMES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES.....	x
RÉSUMÉ.....	xi
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 La cancérogenèse multi-étapes.....	2
1.1.3 La métastase.....	4
1.1.4 L'angiogénèse.....	5
1.1.4.1 Implication dans les processus physiologiques.....	5
1.1.4.2 L'angiogénèse tumorale.....	6
1.2 La matrice extracellulaire (MEC).....	9
1.2.1 Composition et rôle de la MEC.....	9
1.2.2 La laminine.....	10
1.3 Molécules d'adhésion.....	11
1.3.1 Rôles physiologique et pathologiques des molécules d'adhésion.....	11
1.3.2 La famille des intégrines.....	12
1.3.3 Le CD44.....	14
1.3.4 Le récepteur de la laminine à 67 kDa.....	15
1.4 Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs).....	16
1.4.1 Généralités.....	16
1.4.2 Rôles physiologiques et pathologiques des MMPs.....	17



1.4.3	Classification des MMPs.....	18
1.4.4	Structure des MMPs.....	18
1.4.5	Mécanismes de régulation des MMPs.....	20
1.4.5.1	Généralités.....	20
1.4.5.2	Transcription des MMPs.....	20
1.4.5.3	Activation des proMMPs.....	21
1.4.5.4	Inhibiteurs des MMPs.....	22
1.5	La MMP-9.....	23
1.5.1	Caractéristiques.....	23
1.5.2	Régulation de la MMP-9.....	25
1.5.2.1	Transcription de la MMP-9.....	25
1.5.2.2	Sécrétion de la MMP-9.....	28
1.5.2.3	Activation de la proMMP-9.....	29
1.5.2.4	Inhibition de la MMP-9.....	30
1.5.2.5	Autres mécanismes de régulation de la MMP-9.....	31
1.5.2.6	HuR, un élément stabilisateur de l'ARNm de la MMP-9.....	32
1.5.3	Rôles de MMP-9 diverses pathologies.....	35
1.6	Approches thérapeutiques contre le cancer.....	37
1.6.1	Généralités.....	37
1.6.2	Le PCK3145.....	39
1.6.3	Le thé vert.....	42
1.6.4	Les modèles cellulaires utilisés.....	43
1.7	Buts de la recherche.....	45

## CHAPITRE II

PRESENTATION GENERALE DU PROJET DE RECHERCHE.....		62
2.1	Introduction.....	62
2.2	Contribution du 67LR dans la régulation de MMP-9 par des agents anti-cancéreux: le PCK3145 et les catechines du thé vert .....	63
2.3	Implications de HuR dans les effets anti-cancéreux du PCK3145 et des catéchines du thé vert.....	63

CHAPITRE III	
MANUSCRITS.....	65
3.1 “Contribution of the 37-kDa laminin receptor precursor in the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 cell surface binding.” Annabi B., CURRIE JC., Bouzeghrane M., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> . 2006; <u>346</u> : 358-366.....	66
3.2 “Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling.” Annabi B., Bouzeghrane M., CURRIE JC., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R. <i>Anti-Cancer Drugs</i> . 2006; <u>17</u> : 429-438.....	93
3.3 “Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG” Annabi B., CURRIE JC., Moghrabi A. & Béliveau R. <i>Leukemia Research</i> . 2007; <u>31</u> : 1285-1292.....	122
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	147
4.1 Le PCK3145 lie les récepteurs de la laminine à la surface cellulaire pour moduler la sécrétion de MMP-9.....	148
4.2 L’inhibition de la sécrétion de MMP-9 par le PCK3145 cible la déstabilisation du transcript de MMP-9 via la signalisation intracellulaire de ERK modulée par les récepteurs de la laminine.....	154
4.3 L’inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du thé vert s’effectue par des mécanismes similaires d’action .....	158
CHAPITRE V	
CONCLUSIONS.....	164
5.1 Les perspectives thérapeutiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert dans la lutte contre le cancer.....	164
RÉFÉRENCES.....	167

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les facteurs de risque du cancer.....	46
1.2 Les incidences et mortalités des cancers les plus répandus dans le monde.....	47
1.3 Les grandes étapes d'initiation, de promotion et de progression de la cancérogénèse multi-étapes.....	48
1.4 Les grandes étapes du processus métastatique.....	49
1.5 Schéma de certains sites actifs de la laminine-1 impliqués dans la modulation de l'adhésion cellulaire, la migration, l'activité des protéases, la prolifération, la croissance tumorale, l'angiogénèse et la métastase.....	51
1.6 Structures des différents domaines des MMPs .....	54
1.7 Mécanismes de régulation des MMPs : la transcription, l'activation des proMMPs et l'inhibition de l'activité protéolytique des MMPs .....	55
1.8 Cascade d'activation des MMPs .....	56
1.9 Les voies de signalisation cellulaire qui contribuent à la transcription du gène de MMP-9.....	57
1.10 La séquence d'acides aminés du PCK3145.....	59
1.11 Les homologues de structure du PCK3145 avec les chaînes précurseurs $\alpha 2$ , $\alpha 5$ et $\beta 1$ de la laminine .....	60
1.12 Structure moléculaire des différentes catéchines du thé vert.....	61

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Inhibiteurs et activateurs endogènes modulant l'angiogénèse tumorale.....	50
1.2 Les récepteurs de la laminine et leurs ligands.....	52
1.3 Les MMPs, leurs substrats et leur expression dans les types cellulaires.....	53
1.4 Liste de ARE-BP ( <i>AU-rich elements binding protein</i> ) et de leurs effets sur la stabilité et la traduction de certains ARNm contenant des éléments riche en adénosine et uridine.....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APMA	<i>para-aminophenylmercuric acetate</i>
AP	protéine activatrice
APS	persulfate d'ammonium
AREs	<i>adenosine and uridine-rich elements</i>
ARE-BPs	<i>adenosine and uridine-rich binding proteins</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
bFGF	facteur de croissance fibroblastique basique
BSA	albumine sérique bovine
C	catéchine
Cg	catéchine gallate
DMEM	milieu Eagle modifié par Dulbecco
EC	épicatéchine
ECg	épicatéchine gallate
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EGC	épigallocatechine
EGCg	épigallocatechine gallate
EGF	facteur de croissance de l'épithélium
EGFR	récepteur au EGF
ELAV	<i>embryonic lethal adnormal vision</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FTTC	<i>Fluoresceinisoithiocyanate</i>
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
GTP	guanidine tris phosphate
HA	acide hyaluronique
HBMEC	<i>human brain endothelial microvascular cells</i>
HIF	<i>hypoxia induced factor</i>
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
HL-60	cellules promyélocytaires leucémiques humaines
HRPC	cancer de la prostate réfractaire aux hormones
HT-1080	cellules de fibrosarcome humain
IGF	facteur de croissance analogue à l'insuline
IL	interleukine
IFN	interferon
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
67LR	récepteur de la laminine à 67-kDa
37LRP	précurseur du 67LR à 37-kDa
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-associated protein</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MEC	matrice extracellulaire

MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
MT-MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire de type membranaire
NF- $\kappa$ B	facteur nucléaire $\kappa$ B
NO	oxyde nitrique
p38	protéine 38
PAIs	inhibiteurs des activateurs du plasminogène
PAP	phosphatase acide prostatique
PBS	tampon bi-phosphate salin
PDGF	facteur plaquettaire de croissance
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PSA	antigène spécifique de la prostate
PSP94	<i>prostate secretory protein 94</i>
PVDF	polyvinylidène difluorure
RAP	<i>receptor associated protein</i>
RECK	<i>reversion-induced-cystein-rich-protein with kazal motifs</i>
Rho	gène homologue de la famille de Ras
RhoA	gène homologue de la famille de Ras, membre A
RT-PCR	transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	dodécyle-sulphate de sodium
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAMs	<i>tumor associated macrophages</i>
TBS	tampon tris salin
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthylènediamine
TGF	facteur de croissance des tumeurs
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
TNF	facteur de nécrose tumoral
TPA	phorbol 12-tétradécanoyl 13-acétate
tPA	activateur tissulaire du plasminogène
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminoéthane
TX-100	triton X-100
uPA	activateur du plasminogène de type urokinase
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	récepteur du VEGF
WCR	<i>World Cancer Report</i>

## LISTE DES SYMBOLES

%	pourcentage
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\kappa$	kappa
$^{\circ}\text{C}$	degré Celcius
kDa	kilo Dalton
min	minute
$\mu\text{l}$	microlitre
ml	millilitre
$\mu\text{M}$	micromolaire
mM	millimolaire
nM	nanomolaire
nm	nanomètre
$\mu\text{g}$	microgramme
mg	milligramme
rpm	rotations par minute



## RÉSUMÉ

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) jouent un rôle crucial dans le développement malin des tumeurs. Elles dégradent la matrice extracellulaire (MEC) permettant ainsi la migration des cellules cancéreuses vers d'autres foyers distants, un processus d'invasion tumorale appelé métastase. L'expression de la MMP-9, aussi appelée gélatinase B, est fortement associée à ce processus et corrèle avec l'agressivité des cellules tumorales. Son expression peut être régulée à différents niveaux via des voies de signalisation intracellulaires, notamment au niveau de l'expression du gène, de sa transcription, de la stabilité de son ARNm, de la traduction ou de la sécrétion de la protéine.

Le développement d'agents anti-tumoraux pouvant cibler différentes étapes de la progression du cancer est présentement en cours. Le PCK3145, un peptide synthétique, dérivé de la PSP94, dirigé contre le cancer de la prostate avancé et métastasé est au stade d'essais cliniques en phase II. Les études cliniques jumelées à plusieurs autres travaux effectués dans des modèles *in vivo* murins, démontrent que ce peptide réduit la croissance et la progression tumorale en diminuant les concentrations plasmatiques de MMP-9. De par leurs diverses fonctions anti-tumorales, les catéchines du thé vert sont aussi reconnues pour leur potentiel inhibiteur des MMPs. Nos travaux visent donc à élucider *in vitro* les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des fonctions de la MMP-9 par les effets anti-métastatiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert. Dans un premier temps, nous avons étudié les processus d'interaction en surface cellulaire du PCK3145. Nos résultats montrent que l'effet anti-métastatique d'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 est médié par les récepteurs de la laminine, particulièrement le récepteur à la laminine de 67kDa (67LR) localisé à la membrane plasmique. En second lieu, nous approfondissons le mécanisme intracellulaire par lequel l'interaction du PCK3145 avec les récepteurs de la laminine en surface cellulaire module la sécrétion de la MMP-9. Nous démontrons que cette interaction active la voie des MAPK/ERK et mène à l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 via une diminution de l'expression de HuR, une protéine intracytoplasmique stabilisatrice de l'ARNm de la MMP-9 liant les séquences riches en adénosine et uridine. Finalement, nous montrons que le mécanisme d'action de l'inhibition de la sécrétion de MMP-9 par les catéchines du thé vert est étroitement lié à celui du PCK3145.

Les propriétés anti-métastatiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert peuvent être dirigées contre plusieurs types de tumeurs liés à l'augmentation de l'expression de la MMP-9 et de la dégradation de la MEC associés au processus métastatique. De plus, l'identification des récepteurs de la laminine, particulièrement le 67LR pouvant moduler ces effets, permet d'envisager de cibler des cancers où l'expression ou les taux élevés de ce type de récepteur sont associés.

**Mots clés :** cancer, métastase, angiogénèse, matrice extracellulaire, laminine, récepteur à la laminine de 67kDa, MMP-9, HuR, ERK, PCK3145, catéchines du thé vert.



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

##### 1.1.1 Généralités

Le cancer a pris des proportions planétaires et représente un défi de taille pour la santé publique. En 2002, environ 11 millions de personnes se sont vues diagnostiquées un cancer dans le monde, et plus de 7 millions en décèdent chaque année. On estime que plus de 25 millions de personnes sont actuellement atteintes d'un cancer dans le monde (Kamangar, Dores et Anderson, 2006). Selon le *World Cancer Report* (WCR) publié en 2003 par la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) qui fait partie de l'Organisation Mondiale de la Santé, la fréquence des cancers pourrait augmenter de 50% dans une vingtaine d'années soit avec 15 millions de nouveaux cas en 2020 (WCR, 2003). Au Canada seulement, on estime à 153 100 les nouveaux cas de cancer et à 70 400 morts en 2006 (Canadian Cancer Statistics, 2006).

Dans les pays industrialisés, la mortalité globale par cancer est plus de deux fois supérieure à celle des pays en développement. À l'échelle mondiale, 12% de la population décède d'un cancer tandis que ce pourcentage dépasse les 25% dans les pays industrialisés. Le fardeau social et économique du cancer est plus élevé dans les pays riches et serait probablement causé par un mode de vie débalancé, principalement dû à l'importance du tabagisme et d'une alimentation déséquilibrée pour ne nommer que ces derniers (Figure 1.1). Dans les pays en développement, plus d'un quart des cancers est causé par des agents infectieux (Kamangar, Dores et Anderson, 2006).

Mondialement, les types de cancers les plus fréquents sont, à l'exception du cancer de la peau, le cancer du poumon, du sein et colo-rectal (Figure 1.2). Toutefois, comme les facteurs de risque aux cancers sont différents entre les pays riches et pauvres, l'incidence de certains types de cancers varie selon ces sociétés. Parmi celles-ci, les pays occidentaux semblent favoriser le développement du cancer colo-rectal et de la prostate, où les facteurs alimentaires seraient censés jouer un rôle majeur dans la progression de ces cancers (Gonzalez, 2006; Gallus, Bosetti et La Vecchia, 2004). Les infections chroniques dans les pays en développement favorisent le cancer du foie par le virus de l'hépatite B, du col de l'utérus par le virus du papillome humain et de l'estomac par la bactérie *Helicobacter pylori*. La disparité mondiale de l'incidence de certains types de cancer semble être largement attribuable à des différences de mode de vie (Parkin, 2004).

Malgré la progression alarmante du cancer dans le monde, quelques faits sont encourageants. Dans certains pays occidentaux, les taux de mortalité par cancer ont récemment commencé à décroître. Ceci serait relié à une diminution de la prévalence du tabagisme, une amélioration de la détection précoce et à des avancées dans le traitement du cancer (section 1.6). De plus, il a déjà été montré que la vaccination contre le virus de l'hépatite B pouvait prévenir le développement du cancer du foie dans les régions où l'incidence de ce cancer était élevée (Degos, 2006). Également, il est possible que le vaccin contre le virus du papillome humain deviendra réalité d'ici quelques années (Hymel, 2006; Simon et Dupond, 2006). Aujourd'hui, plus de 80% des décès parmi les femmes par le cancer du col de l'utérus sont enregistrés dans les pays en développement. La prévention de l'infection virale et l'accessibilité aux vaccins apporteraient une immense contribution à la santé mondiale, particulièrement aux populations des pays plus démunis.

### **1.1.2 La cancérogenèse multi-étapes**

Les tumeurs se composent de cellules dont la croissance et les caractéristiques morphologiques sont nettement différentes de celles des cellules normales. Les critères de malignité comprennent l'augmentation de la prolifération cellulaire, la disparition de la différenciation, une croissance infiltrante et la métastase à d'autres organes (Gupta et

Massague, 2006). Les tumeurs malignes sont considérées comme étant monoclonales, c'est-à-dire que chaque tumeur proviendrait d'une seule cellule. La transformation maligne est un processus multi-étapes, typiquement d'une lésion bénigne vers une tumeur maligne (Hunter, 2004). Cette évolution des cellules malignes est provoquée par l'accumulation consécutive d'altérations des gènes responsables du contrôle de la prolifération cellulaire, de la mort cellulaire et du maintien de l'intégrité génétique (Figure 1.3) (Compagni et Christofori, 2000).

Le concept de cancérogenèse multi-étapes, maintenant établi dans la communauté scientifique, est représenté par au moins trois stades distincts soit l'initiation, la promotion et la progression (Beckman et Loeb, 2005; Bignold, 2004; Bocchetta et Carbone, 2004). L'*initiation* est le processus par lequel une cellule somatique acquiert une mutation génétique qui ne lui est pas létale mais dont les cellules filles hériteront. Cette première mutation peut procurer à la cellule un avantage prolifératif qui sera nécessaire lors du deuxième stage de promotion. Comparativement aux cellules avoisinantes, cette cellule initiée peut échapper aux mécanismes de régulation cellulaire. La *promotion* est le processus par lequel les cellules initiées sont exposées à un promoteur tumoral et subissent une expansion clonale phénotypique. Les promoteurs tumoraux peuvent être des stimuli externes ou internes. Seulement les cellules initiées sont stimulées à proliférer. Le signal permettant l'expansion clonale peut être le résultat d'effets directs du promoteur tumoral ou d'effets indirects d'un promoteur tumoral provenant de cellules adjacentes. Toutefois, l'initiation et la promotion tumorale entraînent un avantage prolifératif relativement bénin. C'est dans la troisième étape de la cancérogenèse multi-étapes que ces cellules effectuent une conversion maligne. Ce processus est généralement lent, survient sur une longue période de temps et est fortement altéré par des agents qui affectent la croissance cellulaire tels les hormones, les facteurs de croissance, la vitamine A et les rétinoïdes, la vitamine D, le folate et le calcium pour n'en nommer que quelques-uns (Divisi *et al.*, 2006). Le processus de *progression*, ou de conversion maligne, nécessite une altération génétique tout comme l'étape d'initiation. Dans cette étape, la croissance cellulaire est d'avantage dérégulée et la cellule opère de manière incontrôlée. La progression est probablement l'étape la plus complexe puisque des changements génétiques et phénotypiques surviennent parallèlement.

Suite à ces changements, l'expansion cellulaire est rapide. Ce stade est affecté par les rétinoïdes, les inhibiteurs de la croissance cellulaires et les antioxydants (Buletic, Soprano et Soprano, 2006; Donaldson, 2004). Toutefois, lorsque la tumeur progresse, sa sensibilité aux composés diététiques, inhibiteurs de croissance et promoteurs impliqués dans la différenciation cellulaire disparaît graduellement jusqu'à ce que la tumeur devienne plus autonome. L'autonomie de la tumeur est associée au développement d'un cancer clinique et implique des interventions thérapeutiques drastiques (section 1.6.1) (Valko *et al.*, 2006; Klaunig et Kamendulis, 2004).

La transformation maligne serait l'aboutissement d'une série de changements génétiques précis qui engendreraient des phénotypes cellulaires anormaux particuliers. Les conséquences biologiques de ces altérations génétiques seraient la prolifération cellulaire autonome, la dérégulation des mécanismes de réparation de l'ADN, la diminution de l'apoptose, la capacité d'invasion locale et l'activation de l'angiogénèse (Bignold, 2004; Bertram, 2000). L'ensemble de ces altérations serait nécessaire au développement d'un cancer. Les « oncogènes » et les « gènes suppresseurs de tumeurs » sont les gènes impliqués dans ces événements séquentiels de la progression tumorale (Bocchetta et Carbone, 2004).

### 1.1.3 La métastase

La métastase est la cause première de mortalité chez les patients atteints du cancer. Elle représente la dissémination de cellules cancéreuses d'une tumeur primaire à un organe distant et se caractérise principalement par leurs capacités à traverser les barrières vasculaires et tissulaires. La métastase est un processus sélectif qui requière que les cellules tumorales réussissent à franchir plusieurs étapes séquentielles. Elles doivent se détacher de la tumeur primaire, envahir le stroma de l'hôte, intravaser dans les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, se rendre jusqu'aux capillaires de l'organe distant, puis extravaser et proliférer dans le parenchyme de l'organe réceptif (Figure 1.4). Les cellules qui réussissent à métastaser ont initialement subi des changements dans leur potentiel prolifératif, migratoire et/ou invasif, ainsi que dans la survie (Yamaguchi, Wyckoff et Condeelis, 2005; Hoon *et al.*, 2006).

Depuis les dernières années, plusieurs systèmes expérimentaux ont démontré que le microenvironnement tumoral était un joueur clé non seulement dans l'initiation mais également dans la progression tumorale. Le stroma normal module l'homéostasie cellulaire de manière à ce qu'elle exerce des fonctions physiologiques spécifiques aux tissus et prévient la croissance, l'apoptose et la différenciation inappropriée. Par contraste, un stroma aberrant supportera une transformation et une dédifférenciation cellulaire (Bhowmick et Moses, 2005). La formation de tumeur dépend donc des événements génétiques intrinsèques de la cellule tumorale mais également des changements dans le microenvironnement tumoral.

Ce mémoire s'attardera donc, entre autre, aux mécanismes les plus importants impliqués dans les processus métastatiques notamment la croissance tumorale (section 1.1.2), l'angiogénèse (section 1.1.4), l'adhésion cellulaire (section 1.3) et la protéolyse de la matrice extracellulaire (sections 1.4 et 1.5).

#### **1.1.4 L'angiogénèse**

##### **1.1.4.1 Implication dans les processus physiologiques**

L'angiogénèse est le développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus physiologique est essentiel dans le développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte au cours du cycle de reproduction chez les femmes (endomètre, corps jaune et placenta) et lors de la réparation tissulaire (Carmeliet, 2005; Liekens, Clercq et Neyts, 2001). Ces processus sont soumis à une régulation très précise, classiquement définie comme une balance dynamique entre des activateurs et des inhibiteurs. Elle implique notamment l'action concertée de nombreux facteurs de croissance tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et les angiopoïétines. Le VEGF est un facteur primordial dès les étapes les plus précoces de la formation vasculaire. Il induit la différenciation des cellules endothéliales, leur prolifération et leur migration. Les angiopoïétines interviennent plus tardivement dans l'angiogénèse et permettent la maturation des vaisseaux et leur stabilisation. Elles peuvent également promouvoir la régression vasculaire (Carmeliet, 2003; Gupta et Zhang, 2005).



L'angiogénèse est un phénomène complexe auquel participent plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires. Brièvement, des facteurs proangiogéniques tels des facteurs de croissance et des cytokines au site de la tumeur primaire enclenche les processus de vascularisation de la tumeur. Un des premiers événements observé au cours de l'angiogénèse est la migration des cellules endothéliales vers la source du signal proangiogénique. En réponse à ce signal, les cellules endothéliales sécrètent des métalloprotéinases de la matrice afin de digérer les constituants de la membrane basale leur permettant de migrer. Les cellules endothéliales produisent ensuite une nouvelle membrane basale, ce qui permet la formation d'un nouveau vaisseau sanguin fonctionnel (Carmeliet, 2005, Liekens, Clercq et Neyts, 2001).

L'angiogénèse est fortement réactivée au cours de la croissance tumorale et il est maintenant clairement établi que la croissance tumorale est conditionnée par le déclenchement d'une conversion angiogénique (*angiogenic switch*). Ainsi, si le signal provient de cellules tumorales, le processus angiogénique crée un réseau de vascularisation autour de la tumeur et permet la croissance, l'invasion puis la métastase tumorale (Naumov, Akslen et Folkman, 2006).

#### **1.1.4.2 L'angiogénèse tumorale**

La progression tumorale, dans la croissance et dans la métastase, est dépendante de l'angiogénèse. Cette néovascularisation permet d'acheminer l'oxygène et les nutriments nécessaires lors de la progression cancéreuse au site tumoral (Carmeliet, 2005). Après la transformation néoplasique initiale, les cellules tumorales subissent d'autres changements génétiques. Ceci entraîne la sélection de clones dominants possédant des avantages prolifératifs et un potentiel métastatique distinct. Les tumeurs interagissent activement avec les vaisseaux sanguins. Il a été démontré qu'une tumeur ne peut croître au-delà de 1 à 2 mm<sup>3</sup> sans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La tumeur peut alors parfois réagir en penchant la balance de manière à favoriser un microenvironnement pro-angiogénique. Ce processus est appelé la conversion angiogénique. Ce microenvironnement tumoral comprend typiquement un milieu hypoxique, une augmentation de facteurs pro-angiogénique et de

cytokines qui favorisent la croissance, une diminution des facteurs anti-angiogéniques, la sécrétion de métalloprotéinases matricielles, puis une augmentation de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Naumov, Akslen et Folkman, 2006; Gupta et Zhang, 2005; Carmeliet, 2005). Récemment, un mécanisme proposé suggère que, en plus des cellules endothéliales préexistantes, des cellules endothéliales et des cellules précurseurs hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse puissent se mobiliser et incorporer les vaisseaux tumoraux nouvellement formés (Tonini, Rossi et Claudio, 2003).

Les tumeurs ayant effectué une conversion phénotypique angiogénique induisent la formation de nouveaux capillaires et commencent à envahir les tissus avoisinants. Cette conversion angiogénique dépend de la balance nette entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques dans les tumeurs (Tableau 1.1). Par conséquent, le phénotype angiogénique peut être le résultat d'une production de facteurs de croissances, tels VEGF ou FGF-2, et/ou une régulation à la baisse de modulateurs négatifs, comme la thrombospondine-1 (TSP-1), par les cellules tumorales (Rollins, 2006). L'hypoxie, une carence en oxygène, est la force principale qui initie les processus angiogéniques, autant dans l'angiogénèse normale que pathologique (Hickey et Simon, 2006). On retrouve des conditions hypoxiques dans une tumeur lorsque les cellules tumorales en croissance sont trop distantes des capillaires ou lorsque les vaisseaux nouvellement formés sont insuffisants dans leur apport en oxygène (Liekens, Clercq et Neyts, 2001). L'hypoxie induit l'expression du VEGF et de ses récepteurs via HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Induced Factor) et attire les macrophages. De plus, plusieurs oncogènes tels *v-ras*, *K-ras*, *v-raf*, *src*, *fos* et *v-yes* induisent une régulation à la hausse de facteurs angiogéniques comme VEGF et augmente la production de cytokines et d'enzymes protéolytiques (Rak et Yu, 2004). Dans notre laboratoire, nous avons déjà suggéré que les cellules hypoxiques tumorales induisent la migration de cellules progénitrices de la moelle osseuse (Annabi *et al.*, 2003b) un processus pouvant potentiellement contribuer à l'angiogénèse tumorale, et que l'expression de HIF-1 $\alpha$ , menant à l'expression du VEGF, serait dépendante des voies de signalisation intracellulaires de RhoA (Turcotte, Desrosiers et Béliveau, 2003). De plus, il a également été démontré que MT1-MMP, une MMP membranaire, était importante dans les processus angiogéniques de migration des cellules endothéliales (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004).

L'inflammation est également un processus qui stimule la progression du cancer et est associée à l'angiogenèse. Les cellules tumorales produisent plusieurs cytokines et chemokines permettant de recruter les macrophages, cellules mastiques, cellules T et les progéniteurs hématopoïétiques. Le VEGF provenant des tumeurs induit une signalisation conduisant à une survie accrue de certaines de ces cellules. En plus de sécréter des facteurs mitogéniques et de survie pour les cellules stromales et tumorales, les cellules inflammatoires créent un microenvironnement inflammatoire qui favorise l'angiogenèse tumorale, stimule les dommages de l'ADN, facilite l'invasion via le remodelage de la MEC, puis permet d'échapper aux systèmes de surveillance immunologique de l'hôte (Coussens et Werb, 2002). Par exemple, les macrophages associés aux tumeurs (*Tumor Associated Macrophages* : TAMs) s'accumulent dans les régions tumorales hypoxiques et produisent des facteurs angiogéniques comme le VEGF, le VEGF-C et le VEGF-D. Les monocytes exprimant Tie-2 (TEMs), les cellules mastiques et les plaquettes relâchent également des facteurs pro-angiogéniques. Certaines chemokines attractrices de leucocytes, tel l'interleukine-8, stimulent directement la croissance de cellules endothéliales. Bref, les sous-types de leucocytes produisent une panoplie de facteurs angiogéniques tels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance placentaire (PlGF), le facteur plaquettaire de croissance (PDGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF), l'angiopoïétine (Ang)-2, le facteur de croissance de l'épithélium (EGF), le facteur de croissance des tumeurs (TGF)- $\beta$ 1, plusieurs interleukines et protéases, dont les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) (Carmeliet, 2003; Liekens, Clercq et Neyts, 2001).

Les vaisseaux tumoraux se distinguent des vaisseaux normaux par leur structure dilatée chaotique et donc par leur perméabilité accrue (Jain, 2002). Cette néovascularisation tumorale est fuyante (ou *leaky*), principalement due à la présence de membranes basales fragmentées et à une stabilisation vasculaire incomplète par les péricytes (Chantrain *et al.*, 2006; Carmeliet et Jain, 2000). Elle favorise donc un microenvironnement pro-inflammatoire et facilite la dissémination métastatique.



## 1.2 La matrice extracellulaire

### 1.2.1 Composition et rôle de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est l'élément caractéristique du tissu conjonctif et représente tout matériel tissulaire qui ne fait pas partie d'une cellule. On retrouve deux principaux domaines dans la MEC: la membrane basale et la matrice interstitielle. La membrane basale est une couche condensée de la matrice qui est formée de manière adjacente aux cellules épithéliales, endothéliales, musculaires et les cellules de schwann ainsi que les adipocytes. La caractéristique principale commune des deux domaines est que leur structure de base est définie par un échafaudage de collagène, la glycoprotéine la plus abondante de la MEC. Toutefois, le type de collagène qui constitue l'échafaudage des domaines ainsi que l'architecture tridimensionnelle de celle-ci sont bien différentes (Bosman et Stamenkovic, 2003).

L'adhésion de glycoprotéines, incluant la laminine et la fibronectine, et de protéoglycants à l'échafaud de collagène permet l'interaction avec les cellules se trouvant à l'intérieur ou adjacentes à la matrice. L'interaction avec ces cellules est assurée par des récepteurs de la matrice, principalement par la famille des intégrines. Les différents constituants de la MEC sont synthétisés et sécrétés par les cellules telles les fibroblastes et les chondroblastes. La MEC n'est pas statique, elle est constamment remodelée par des protéases, notamment par la famille des métalloprotéinases de la matrice (MMP) (section 1.4) (Davis et Senger, 2005). En plus de contenir plusieurs composants protéiques tels la fibrine, l'élastine, la fibronectine, la laminine et le nidogène, la MEC contient des minéraux tels que l'hydroxylapatite ou des fluides tels le plasma sanguin ou le sérum. De plus, la MEC séquestre et entrepose une grande variété de facteurs de croissance cellulaires, tels le FGF, le TGF- $\beta$ , le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) (Corda, Samuel et Rappaport, 2000; Taipale et Keski-Oja, 1997). Le changement des conditions physiologiques peut enclencher des activités protéolytiques et entraîner la libération de ces facteurs. Une fois libérés, ces facteurs de croissance permettent une activation rapide et locale de fonctions cellulaires sans être synthétisés *de novo* (Bosman et Stamenkovic, 2003).

Par sa grande diversité, la MEC possède donc plusieurs fonctions. Elle procure un support et un ancrage pour les cellules, un moyen pour séparer les différents tissus et est impliquée dans la régulation de la communication intercellulaire (Mueller et Fusenig, 2004). La MEC module donc le comportement dynamique des cellules.

### 1.2.2 La laminine

La laminine, accompagnée du collagène de type IV, est une des composantes majeures de la membrane basale. Depuis sa découverte dans un sarcome murin il y a plus de 20 ans, plusieurs homologues de la laminine ont été répertoriés (Patarroyo, Tryggvason et Virtanen, 2002). La laminine possède trois sous-unités, soit  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . À ce jour, cinq chaînes  $\alpha$ , trois chaînes  $\beta$  et trois chaînes  $\gamma$  ont été identifiées. Toutefois, toutes les combinaisons de ces trois chaînes ne semblent être utilisées puisque seulement 16 isoformes distincts de la laminine ont, à ce jour, été isolés (Aumailley *et al.*, 2005). Toutes les chaînes de la laminine ont des éléments structuraux en commun. Elles partagent des petits domaines globulaires dont un est impliqué dans la polymérisation des chaînes. Elles ont également en commun des séquences répétitives semblables au EGF (*Epidermal growth factor-like repeats*) qui sont des sites de liaison au nidogène. Le nidogène permet ainsi de lier la laminine au collagène de type IV. Toutefois, certaines structures sont spécifiques aux différentes chaînes. Par exemple, la chaîne  $\alpha$  possède un gros domaine globulaire en C-terminal agissant comme site de liaison pour les intégrines (Colognato et Yurchenco, 2000).

Les isoformes de laminine sont synthétisées par une variété de cellules de manière spécifique aux tissus. Notamment, pratiquement toutes les cellules épithéliales, les cellules musculaires (lisses, squelettiques et cardiaques), les cellules endothéliales, les cellules nerveuses et les cellules de la moelle osseuse synthétisent la laminine. Les cellules épithéliales expriment seulement les chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  et  $\gamma 2$  tandis que les chaînes  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\gamma 1$  sont exprimées de manière moins spécifique. Les cellules qui synthétisent la laminine la déposent surtout, mais pas exclusivement, dans la membrane basale. Les isoformes de laminine semblent avoir une multitude d'effets sur les cellules adjacentes notamment sur l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Elles exercent leurs

effets principalement par l'entremise des intégrines qui, pour la plupart d'entre elles, réorganisent la laminine (section 1.3.2). Le rôle premier de la laminine semble être comme modulateur des interactions entre les cellules et la MEC, particulièrement la membrane basale. Certaines de ces interactions sont impliquées dans la modulation de fonctions spécifiques. Par exemple, la laminine-1 induit la différenciation cellulaire des cellules épithéliales tandis que la laminine-2 promouvoit l'excroissance de neurites à partir de cellules neuronales. La laminine-5 serait impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire. Cette dernière fonction serait dépendante du traitement protéolytique de la laminine par la plasmine ou les MMPs (notamment MT1-MMP et MMP-2). La laminine-5 et 10 se retrouvent principalement dans la membrane basale vasculaire et médient l'adhésion des plaquettes, leucocytes et des cellules endothéliales (Colognato et Yurchenco, 2000; Aumailley et Smyth, 1998).

On a attribué aux différentes isoformes de laminines plusieurs rôles dans la structure tissulaire et les fonctions cellulaires. Pour cette raison, il n'est pas surprenant que les diverses laminines soient impliquées dans plusieurs processus reliés aux maladies. Depuis des années, le rôle des laminines dans l'invasion tumorale, la métastase et l'angiogénèse a été bien documenté (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005). Le rôle attribué à certains sites actifs retrouvés dans la laminine-1 à la progression tumorale est illustré dans la Figure 1.5. Ces études montrent qu'une régulation désorganisée de l'interaction entre les cellules cancéreuses et la MEC est accompagnée par une synthèse, composition des chaînes et modification protéolytique aberrantes des laminines (Patarroyo, Tryggvason et Virtanen, 2002).

### **1.3 Molécules d'adhésion**

#### **1.3.1 Rôles physiologiques et pathologiques des molécules d'adhésion**

Les interactions intercellulaires et des cellules avec la MEC sont d'une grande importance dans plusieurs processus physiologiques de croissance, apoptose, différenciation et migration cellulaire mais également dans l'invasion et la dissémination des cancers. Ces fonctions sont médiées par plusieurs molécules d'adhésion et récepteurs en surface

cellulaire. Plusieurs familles de molécules d'adhésion ont été identifiées, et une mauvaise régulation de leur synthèse et de leur expression à la membrane cellulaire est souvent associée à des phénotypes invasifs et métastatiques (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005).

Les bilans des études sur les tumeurs métastatiques ont clairement montré que l'adhésion cellulaire joue un rôle primordial dans plusieurs étapes de la cascade métastatique et qu'une mauvaise régulation de l'adhésion contribuerait à la formation de métastases (Okegawa *et al.*, 2004; Skubitz, 2002). Certaines interactions adhésives peuvent même diminuer les processus métastatiques. Par exemple, les molécules d'adhésion qui promeuvent les interactions intercellulaires de cellules homotypiques dans la tumeur primaire diminueraient le potentiel métastatique. Dans ce contexte, une régulation à la baisse de ces molécules d'adhésion inciterait le détachement de cellules tumorales du site primaire ainsi que leur potentiel d'invasion. D'autre part, une augmentation de certaines molécules d'adhésion corrèle avec une augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales (Baluna, Eng et Thomas, 2006). Par exemple, l'adhésion préférentielle de certaines cellules tumorales métastatiques aux cellules endothéliales vasculaires pourrait expliquer, en partie, les profils d'expression spécifiques à certains organes de certaines molécules d'adhésion et favoriserait ainsi la dissémination tumorale.

Plusieurs molécules d'adhésion ont déjà été répertoriées. Toutefois, ce Mémoire se penchera principalement sur les différents récepteurs de la laminine, tels la famille des intégrines et le récepteur à la laminine de 67kDa, ainsi que sur le récepteur CD44. Les principaux récepteurs de la laminine ainsi que leurs ligands sont présentés dans le Tableau 1.2.

### 1.3.2 La famille des intégrines

L'invasion et la survie des cellules *in vivo* contrôlent des processus physiologiques tels le développement embryonnaire et l'angiogénèse ainsi que des processus pathologiques tels les métastases tumorales. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans les interactions intercellulaires et cellules avec la MEC en jouant un rôle clé

dans la régulation normale et tumorale de la migration et de la survie cellulaire (Eble et Haier, 2006). À ce jour, la famille des intégrines est constituée d'au moins 24 hétérodimères formés par l'association d'une des 18 sous-unités  $\alpha$  avec une des 8 sous-unités  $\beta$  (Stupack, 2005).

Les intégrines modulent l'adhésion cellulaire aux protéines de la MEC et de la membrane basale mais peuvent également transduire des signaux intracellulaires et promouvoir la migration et la survie cellulaire (Jin et Varner, 2004). Toutefois, contrairement aux récepteurs de facteurs de croissance, les intégrines n'ont aucune activité enzymatique intrinsèque mais peuvent activer des voies de signalisation strictement en s'associant avec des protéines kinases et adaptatrices dans les complexes d'adhésion focale. Plusieurs voies de signalisation régulées par les intégrines sont activées durant le développement tumoral afin de faciliter l'invasion cellulaire (Guo et Giancotti, 2004). Suite à la liaison des intégrines aux composants de la MEC, les cellules sont ancrées par des sites spécialisés appelés « contacts focaux ». Dans ces sites, on observe un regroupement de récepteurs intégrines qui enclenche une cascade signalétique menant directement à l'activation des voies MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) permettant ainsi la régulation de l'expression de certains gènes. Dans une de ces cascades, l'association des récepteurs intégrines peut mener à l'autophosphorylation d'une tyrosine de la protéine appelé kinase d'adhésion focale (FAK). FAK interagit avec le domaine cytoplasmique de différentes sous-unités des intégrines  $\beta$  via les protéines spécialisées cytoplasmiques telles la taline, la vinculine et la paxilline. Outre l'activation de ERK et JNK, les cascades MAPKs sont également activées par des petites protéines de liaison au GTP de la famille des Rho qui régulent la réorganisation du cytosquelette d'actine. En plus de la liaison à différents constituants de la MEC, les intégrines peuvent également être activées par des récepteurs de facteurs de croissance (Eliceiri, 2001).

Plusieurs types de cancers, tels les mélanomes, les glioblastomes, le cancer de la prostate, du sein et de l'ovaire, surexpriment certaines de ces intégrines. La surexpression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  et  $\alpha_6\beta_4$  semble particulièrement importante lors de la progression tumorale (Kopfein et Christofori, 2006).

### 1.3.3 Le CD44

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire. Cette molécule d'adhésion en surface cellulaire est impliquée dans les interactions intercellulaires et de cellules avec la MEC (Nagano et Saya, 2004). CD44 serait impliqué dans plusieurs processus moléculaires, tels l'adhésion spécifique, la transduction de signaux et dans la migration cellulaire dont l'extravasation de leucocytes au site d'inflammation. L'épissage alternatif de dix exons variants (v1-v10) est responsable de la création de plus de 20 différentes isoformes de la protéine CD44 (CD44v) (Bajorath, 2000). La molécule standard de CD44 (CD44s) ne contient aucune de ces régions variantes. CD44s est une molécule à simple chaîne qui est composée d'un domaine extracellulaire hautement glycosylé contenant le site de liaison au ligand, une région membranaire proximale, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. CD44 lie préférentiellement l'acide hyaluronique mais peut également lier le collagène de type I, la laminine, la fibrine, la fibronectine et le sulfate de chondroïtine (Isacke et Yarwood, 2002).

CD44s est l'isoforme la plus abondamment exprimée. L'épissage alternatif de CD44 est étroitement régulé et survient seulement dans des types cellulaires et dans des états d'activation particuliers. Les mécanismes de contrôle de l'expression de CD44 sont peu connus. Toutefois, son expression et la présence anormale de certaines isoformes ont été corrélés à plusieurs pathologies et au caractère malin de certains cancers. Le clivage de CD44 en surface cellulaire est un des mécanismes connus par lequel son expression peut être diminuée. Ce phénomène surviendrait instantanément ou en réponse à une stimulation par des cytokines. Le clivage de CD44 par MT1-MMP est le mécanisme le mieux caractérisé (Annabi *et al.*, 2005; Kajita *et al.*, 2001). Le clivage de CD44 par MT1-MMP génère un fragment soluble de 70kDa provenant du domaine extracellulaire. De plus, MT1-MMP et CD44 sont co-localisés dans les extrémités adhérentes de cellules en migration (lamellipode) puis le clivage de CD44 par MT1-MMP mène à une augmentation de la migration cellulaire. Il existe trois sites de clivage qui se retrouvent entre les résidues Lys158-Thr197, entre le domaine de liaison hyaluronique, et au site d'insertion des exons variables (Nagano et Saya, 2004). Le mécanisme précis par lequel le clivage de CD44



stimule la motilité cellulaire n'est pas connu mais il est probable que ce clivage par MT1-MMP permet aux cellules de se détacher de la MEC pour faciliter leur mouvement.

CD44 serait également impliqué dans la modulation des activités protéasiques. Il a été montré que CD44 module la sécrétion et l'activation de la MMP-2 (Takahashi, Eto et Tanabe, 1999) et qu'il peut ancrer la forme protéolytiquement active de la MMP-9 à la surface cellulaires de lignées tumorales (Yu et Stamenkovic, 1999). CD44 et la MMP-9 protéolytiquement active sont retrouvés associés dans les « invadopodes » de cellules qui migrent et permettrait de cibler la dégradation du collagène de type IV puis ainsi promouvoir l'invasion de cellules tumorales. La collaboration entre les MMPs et les récepteurs d'adhésion cellulaire, tel le CD44, pourrait potentiellement permettre une régulation serrée et hautement localisée de la dégradation pérircellulaire de la MEC pour faciliter la migration cellulaire. De plus, l'ancrage localisé à la surface cellulaire de MMP-9 active avec CD44 est important dans le clivage du TGF- $\beta$  latent qui promouvoit la croissance tumorale et l'angiogénèse (Yu et Stamenkovic, 2000).

#### **1.3.4 Le récepteur de la laminine à 67 kDa**

La laminine est une des glycoprotéines majeure de la membrane basale qui est impliquée dans l'attachement, la progression, la migration et la différenciation de cellules normales et néoplasiques. L'interaction entre la laminine et les cellules tumorales est un prérequis pour l'invasion de la membrane basale et la métastase. Le récepteur à la laminine de 67 kDa (67LR) est un récepteur non-intégrine de haute affinité pour la laminine. Son expression à la surface cellulaire dérive des modifications post-traductionnelles de son précurseur de 37 kDa hautement conservé (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005). Il a été suggéré que la formation du 67LR mature provient de l'homo- ou de l'hétérodimérisation du précurseur 37 kDa acylé mais le mécanisme précis de maturation de ce récepteur demeure inexpliqué (Buto *et al.*, 1998). Deux sites de liaison à la laminine ont été identifiés sur le 67LR. Le premier site est appelé peptide G (acide aminé 161-180) et le second site, le peptide 11, se retrouve dans la portion C-terminal (acide aminé 205-229). Ces sites se lient au peptide YIGSR de la chaîne  $\beta$  de la laminine (Givant-Horwitz, Davidson et

Reich, 2005). Le 67LR reconnaît donc plusieurs des sites de liaison de la laminine qui sont différents des sites reconnus par les intégrines. Ceci permettrait une plus grande affinité de liaison du 67LR à la laminine ainsi qu'une régulation de la liaison et de la signalisation autre que médiée par les intégrines.

Le 67LR est impliqué dans plusieurs processus physiologiques, tels l'implantation embryonnaire (Zhang *et al.*, 2000) et l'angiogenèse (McKenna *et al.*, 2001). L'augmentation de l'expression du 67LR a été rapportée dans une variété de tumeurs (côlon, sein, estomac, foie, poumon et ovaire) et est directement corrélée à des hauts taux de prolifération de cellules malignes ainsi qu'à leur potentiel métastatique (Menard, Tagliabue et Colnaghi, 1998). De plus, il a été montré que l'expression du 67LR est associée à la différenciation monocytiques dans les cellules leucémiques promyélocyaires HL-60 et pourrait potentiellement jouer un rôle dans la dissémination de la leucémie (Montuori *et al.*, 1999). L'expression du 67LR et de son précurseur peut être modulée à la hausse par des cytokines, des agents inflammatoires et des protéines de la MEC comme la laminine et la fibronectine (Menard *et al.*, 1997). Il a également été postulé que le 67LR est co-régulé et co-exprimé avec les intégrines  $\alpha_6\beta_4$  et  $\alpha_6\beta_1$  dans certains modèles *in vivo* (Givant-Horwitz *et al.*, 2003; Ardini *et al.*, 1997). Il semble que le 67LR soit colocalisé avec l'intégrine  $\alpha_6$  dans les plaques d'adhésion focale et qu'il est associé aux composants cytoplasmiques  $\alpha$ -actinine et vinculine (McKenna *et al.*, 2001). Finalement, une étude récente démontre que l'implication du 67LR dans l'agressivité des tumeurs repose dans sa capacité à modifier la laminine-1, ce qui entraîne une activation d'enzymes protéolytiques favorisant l'invasion tumorales par la dégradation de la MEC (Berno *et al.*, 2005). Il est important de noter que les processus de signalisation modulés par le 67LR sont peu connus mais semblent impliquer la voie des MAPKs (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005).

#### **1.4 Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs)**

##### **1.4.1 Généralités**

Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont une famille d'endopeptidases sécrétées par plusieurs types cellulaires capables de cliver la majorité des constituants de la



MEC. Par leur capacité de remodeler la MEC, les MMPs jouent un rôle central dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Ces protéases possèdent une grande diversité dans leurs domaines structuraux et dans leur spécificité de substrats, mais détiennent tout de même certaines caractéristiques communes : elles hydrolysent des composants de la MEC telles que des protéines ou des protoéglycans, elles contiennent des ions calcium et zinc nécessaires à leur activité catalytique, elles sont sécrétées sous une forme latente et activable (forme soluble ou ancrée à la membrane) et sont inhibées par leur inhibiteur naturel, les *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) (Chakraborti *et al.*, 2003).

#### 1.4.2 Rôles physiologiques et pathologiques des MMPs

L'interaction entre les cellules et la MEC est cruciale pour le développement et les fonctions normales des organismes. La modulation des interactions entre les cellules et la MEC est possible par l'action de systèmes protéolytiques uniques responsables de l'hydrolyse des différents composants de la MEC. En régulant l'intégrité et la composition de la MEC, les MMPs jouent un rôle clé dans la croissance et le développement des cellules. L'entretien et le remodelage de la MEC doivent être rigoureusement ajustés puisque une protéolyse incontrôlée contribue à générer plusieurs conditions pathologiques caractérisées par un excès ou un manque de dégradation de la MEC. Les MMPs sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques tels l'embryogenèse, la croissance des nerfs, l'ovulation, le cycle endométrial, le remodelage osseux, la réparation tissulaire, l'angiogenèse, l'inflammation et l'apoptose. Une mauvaise régulation des MMPs est associée à plusieurs pathologies telles l'arthrite, des maladies cardiovasculaires, des maladies neurologiques, la rupture de la barrière hémato-encéphalique, la fibrose et cirrhose hépatique, la maladie d'Alzheimer et les cancers pour n'en nommer que quelques-unes (Mandal *et al.*, 2003; Malesud, 2006).

Il est maintenant bien établi que les MMPs jouent un rôle clé dans la cancérogenèse. Les MMPs seraient impliquées dans la progression, la croissance, l'angiogenèse tumorales et la métastase (VanSaun et Matrisian, 2006; Malesud, 2006). Les cellules cancéreuses

utiliseraient les fonctions des MMPs afin d'établir une relation avec le stroma et favoriser un microenvironnement propice au développement tumoral. Les cellules tumorales envahissantes possèdent leur propre répertoire de MMPs. Toutefois, il devient de plus en plus clair que ces cellules invasives modulent, par contact direct ou de manière paracrine, l'expression et la sécrétion de MMPs provenant de cellules stromales, incluant les fibroblastes, les cellules endothéliales et les leucocytes. Les MMPs produites par le stroma joueraient un rôle important dans le remodelage tissulaire dirigé par la tumeur. Elles peuvent non seulement accélérer le processus de remodelage lui-même, mais leur action protéolytique permet la libération de facteurs de croissance séquestrés dans la MEC. Ces facteurs de croissance peuvent alors promouvoir la survie tumorale, l'angiogénèse et contribuer à une dissémination tumorale accrue (Mott et Werb, 2004).

#### 1.4.3 Classification des MMPs

À ce jour, plus d'une vingtaine de MMPs humaines ont été répertoriées (Tableau 1.3). Les MMPs humaines sont principalement classées en cinq groupes basés sur leur structure et leur spécificité de substrats. On retrouve les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs de type membranaire (MT-MMP). Les principaux substrats des collagénases sont le collagène de type I, II et III. Les gélatinases, notamment MMP-2 et MMP-9, hydrolysent principalement les composants de la membrane basale tels la laminine et le collagène de type IV. Les stromélysines hydrolysent principalement l'élastine et le collagène de type IV, V, XI et X. Les MT-MMP ne sont pas classées selon leur spécificité de substrat mais plutôt par leur particularité structurale et par le type d'ancrage à la membrane (Mandal *et al.*, 2003; Chakraborti *et al.*, 2003).

#### 1.4.4 Structures des MMPs

Les membres de la famille des MMPs proviennent de gènes différents, mais les séquences d'acides aminés et les domaines fonctionnels de ces enzymes sont fortement homologues, de 30 à 50% (Massova *et al.*, 1998). La structure primaire des MMPs possède quatre domaines communs, soient un domaine propeptide, un domaine catalytique, un domaine charnière et un domaine hémopexine (Figure 1.6).

Toutes les MMPs nouvellement synthétisées possèdent un peptide signal à l'extrémité N-terminale de 20 acides aminés qui est typiquement clivé lors de leur sécrétion dans l'espace extracellulaire ou lors de leur insertion à la membrane. Le signal peptide est suivi du prodomaine de 80 acides aminés qui contient la séquence unique conservée PRCG(V/N)PD. Cette séquence contient une cystéine qui établit une liaison hydrophobe avec le zinc et permet de maintenir le caractère latent de ces protéases puisqu'elles sont sécrétées sous forme de précurseurs. Lors de l'activation des MMPs, le prodomaine est clivé afin de permettre la libération du domaine catalytique qui devient accessible au substrat, un phénomène appelé « *cysteine switch* » (Pavlaki *et al.*, 2002; Van Wart et Birkedal-Hanson, 1990).

Le domaine catalytique est responsable de l'hydrolyse du substrat. Ce domaine est composé de 170 acides aminés, contient au niveau du site actif la séquence très conservée HEXXHXXGXXH et dépend du zinc et du calcium pour son activité enzymatique. La structure du domaine catalytique des MMPs est très similaire mais on retrouve quelques différences structurales subtiles entre les cinq groupes de substrat. Ces petites subtilités structurales et la différence dans d'autres domaines structuraux joueraient probablement sur la spécificité de substrat des MMPs (Nagase, Visse et Murphy, 2006).

Le domaine charnière relie les domaines catalytiques et hémopexine par une courte séquence d'acides aminés riche en proline. Ce domaine permettrait au domaine hémopexine de recouvrir le domaine catalytique afin de piéger le substrat (Bode *et al.*, 1999). À l'exception de la matrilysine, toutes les MMPs contiennent le domaine hémopexine d'environ 200 acides aminés à l'extrémité C-terminale. Ce domaine favorise les interactions MMP-substrat et contribuerait à la spécificité de substrat (Stamenkovic, 2000). Il a été démontré que le domaine C-terminal de la MMP-2 permet son interaction avec la MT1-MMP ainsi que son interaction avec TIMP-1 et TIMP-2, un phénomène observé également pour la MMP-9 (Chirco *et al.*, 2006).

Certaines MMPs possèdent également des domaines structuraux qui leur sont propres. Par exemple, les gélatinases contiennent un domaine fibronectine indispensable

pour la reconnaissance du substrat, puis la MMP-9 et la MT1-MMP possèdent un domaine de liaison au collagène à l'extrémité C-terminale (Stamenkovic, 2000). De plus, les MT-MMPs contiennent une séquence de 4 acides aminés (RRKR) qui permet leur activation et une séquence conservée (YGYL) dans leur propeptide assurant un rôle de chaperon (Pavlaki *et al.*, 2002).

#### 1.4.5 Mécanisme de régulation des MMPs

##### 1.4.5.1 Généralités

La régulation des MMPs est complexe et semble se jouer sur trois niveaux. Elle serait modulée au niveau de la transcription, de l'activation du proenzyme et de l'inhibition de l'activité enzymatique (Figure 1.7).

##### 1.4.5.2 Transcription des MMPs

Malgré une multitude de recherches sur le sujet de la régulation des MMPs, les mécanismes d'activation transcriptionnelle ne sont pas tout à fait compris. La régulation transcriptionnelle des MMPs semble être modulée par des cytokines, facteurs de croissance, hormones stéroïdiennes, oncogènes, esters de phorbol ainsi que par les contacts intercellulaires et des cellules avec la MEC (Mancini et Di Battista, 2006). Ces facteurs causent des profils d'expression variant selon les différents tissus et ont des effets variables sur les différentes MMPs d'une même famille, ce qui complexifie la compréhension de la régulation des gènes des MMPs autant dans les états physiologiques que pathologiques (Ye, 2000).

L'expression de la majorité des MMPs (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13 et -19) est induite au niveau transcriptionnel. Le promoteur des gènes de ces protéases contient un élément *cis* AP-1 conservé se trouvant à environ 70 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription ainsi qu'un ou plusieurs éléments *cis* du *polyomavirus enhancer A binding-protein-3* (PEA3) (Johansson, Ahonen et Kähäri, 2000). La séquence de nucléotides AP-1 interagit avec les facteurs de transcription des familles Fos et Jun, tandis que l'élément PEA3 est lié par la famille Ets, ce qui permet l'activation du promoteur des MMPs et leur

expression. Les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun sont induits par trois classes de MAPKs, c'est à dire *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinases* (SAPK/JNKs) et p38 (Chakraborti *et al.*, 2003). La balance entre ces voies de signalisation module la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Ces voies peuvent être activées par des stimuli extracellulaires tels les rayons ultraviolets, les interleukines 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  et 8, le TNF- $\alpha$ , le PDGF, le EGF, le VEGF, le TGF- $\beta$  et par les esters de phorbol dont le phorbol-12-myristate 13-acétate (PMA). Les cytokines et les facteurs de croissance peuvent aussi moduler la demi-vie de l'ARNm des MMPs (Johansson, Ahonen et Kähäri, 2000; Ye, 2000).

#### 1.4.5.3 Activation des proMMPs

La plupart des MMPs sont sécrétées sous la forme latente d'un précurseur, ou zymogène, puis sont activées protéolytiquement dans l'espace extracellulaire par un mécanisme de « *cystein switch* » (section 1.4.4). L'activation des proMMPs est effectuée par plusieurs protéases et divers agents *in vitro*. Ces agents, tels l'*aminophenylmercuric acetate* (APMA), le dodecyl-sulfate de sodium (SDS) et les ions chaotropiques, déstabilisent le lien entre le propeptide et l'ion zinc du site actif et permettent ainsi l'autoprotéolyse du propeptide (Murphy *et al.*, 1999). *In vivo*, les MMPs sont activées via une cascade enzymatique impliquant des protéases à sérines telles la plasmine, la cathepsine G, la kalliréine et certaines MMPs, incluant la stromélysine-1, les gélatinases et les MT-MMPs (Figure 1.8). Cette série de réactions protéolytiques dépend en grande partie des activateurs du plasminogène de types urokinase et tissulaire (uPA et tPA) dont le rôle est de convertir le plasminogène en plasmine. La plasmine initie une cascade d'activation des matrixines en clivant le propeptide des proMMP-1 et proMMP-3. La MMP-3 protéolyse la proMMP-7, -8, -9 et -13 en plus de la MMP-1. Le second clivage protéolytique de MMP-1 augmente son activité. Une fois activée, MMP-7 peut activer la proMMP-1 et -2 tandis que la MMP-10 clive la proMMP-8 et que les MMP-2, -3 et -13 peuvent activer la proMMP-9. Finalement, certaines MT-MMPs, tel la MT1-MMP peuvent activer la proMMP-2 et la proMMP-13 (Klein *et al.*, 2004; Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999).

#### 1.4.5.4 Inhibiteurs des MMPs

Les MMPs sont également contrôlées par plusieurs inhibiteurs endogènes spécifiques, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs), et à un moindre degré par des inhibiteurs non spécifiques, tels les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAIs) et l' $\alpha$ -macroglobuline (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999).

Les TIMPs sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et jouent un rôle central dans l'inhibition de l'activité protéolytique des MMPs, mais aussi dans leur activation. La famille des TIMPs est constituée de quatre membres, soit TIMP-1 à TIMP-4. La conformation des TIMPs est stabilisée par 12 résidus cystéines formant 6 ponts disulfures et six boucles. Chaque molécule TIMP contient deux domaines structuraux et fonctionnels distincts, soit un domaine N-terminal composé de trois boucles qui possède l'activité inhibitrice des MMPs et un domaine C-terminal formé de trois boucles et présumément impliqué dans la localisation et/ou la formation de complexes avec les proenzymes. L'inhibition des MMPs actives par les TIMPs s'effectue via la liaison du site actif de la MMP avec les différents sites du domaine N-terminal du TIMP (Chirco *et al.*, 2006). TIMP-1 se lie à la majorité des MMPs actives (collagénase, gélatinase A, matrilysine et stromélysine) mais également à la proMMP-9. Ce complexe TIMP-1/proMMP-9 semble recruter la MMP-3 pour former un complexe plus stable qui résulte en l'inactivation de la MMP-3 (Lambert *et al.*, 2004). TIMP-2 exerce une faible activité inhibitrice vis-à-vis toutes les MMPs mais serait également impliqué dans l'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP (Holmbeck *et al.*, 2004). TIMP-3 et TIMP-4 inhibent respectivement les MMP-1, -2, -3, -9, -13 et les MMP-1, -2, -3, -7, -9 (Nagase, Visse et Murphy, 2006; Lambert *et al.*, 2004). Les TIMP-1, -2 et -4 sont sécrétées sous forme soluble, tandis que TIMP-3 est séquestrée dans la membrane plasmique (Chirco *et al.*, 2006).

Les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAIs) et l' $\alpha$ -macroglobuline inhibent de manière moindre l'activité enzymatique des MMPs (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999). La glycoprotéine  $\alpha$ -macroglobuline inhibe pratiquement toutes les endopeptidases, peu importe leur spécificité de substrat. Le complexe  $\alpha$ -macroglobuline-enzyme est rapidement reconnu par les macrophages et est dégradé dans leurs lysosomes.

Les PAIs (PAI-1 et PAI-2) sont impliqués dans la régulation de l'activité des protéases à sérine uPA et tPA, deux activateurs du plasminogène en plasmine. Ainsi, l'inhibition du tPA et de l'uPA résulte en une répression des cascade d'activation des MMPs (section 1.4.5.3) (Kucharewicz *et al.*, 2003).

Malgré l'implication de plusieurs MMPs dans le développement tumoral. Une revue littéraire plus approfondie sera effectuée pour la gélatinase B, ou MMP-9, puisqu'elle constitue un point central dans ce Mémoire.

## 1.5 La MMP-9

### 1.5.1 Caractéristiques

La MMP-9, ou gélatinase B, est une protéase fortement glycosylée qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire par plusieurs types de cellules. La MMP-9 hydrolyse plusieurs composants de la MEC tels la gélatine (collagène dénaturé), le collagène (de type I, IV, V, VII et X), l'élastase, et des glycoprotéines comme la laminine et la fibronectine. Le status d'activation de la MMP-9 serait également important pour la spécificité de substrat puisque la proMMP-9 possède une haute affinité pour le collagène de type I et la gélatine, tandis qu'elle possède une affinité faible pour le collagène de type IV comparativement à la MMP-9 activée (Van den Steen *et al.*, 2002). L'inhibiteur endogène de la MMP-9 serait le TIMP-1. En plus de dégrader ces composants structurels de la MEC, plusieurs protéines fonctionnelles sont des substrats de la MMP-9. Ces protéines incluent des inhibiteurs de sérines protéase ( $\alpha$ 1-antitrypsine et  $\alpha$ 1-antichymotrypsine), le récepteur à IL2- $\alpha$ , le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\alpha$ ), le pro-facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (proTNF- $\alpha$ ) et certaines chemokines. Le clivage de certaines chemokines par la MMP-9, principalement l'IL-8, permet de générer une forme plus active qui permet une boucle d'amplification positive. Par exemple, l'IL-8 est capable d'induire la libération de MMP-9 dans les neutrophiles (Chakrabarti et Patel, 2005).

Comparativement aux autres membres de la famille des MMPs, la MMP-9 est une des plus complexe structurellement. Elle contient un peptide signal, un propeptide, un domaine catalytique, un domaine *fibronectin-like*, un domaine de liaison au  $Zn^{2+}$ , un

domaine *collagen-V like* et un domaine hemopexine (Figure 1.6) (Van der Steen *et al.*, 2002). Les gélatinases, dont la MMP-9, possèdent un domaine *fibronectin-like* qui est composé de trois séquences répétées et qui seraient insérées entre le domaine catalytique et le domaine de liaison au  $Zn^{2+}$ . Ce domaine serait responsable de la liaison à la gélatine, la laminine et le collagène de type I et V. De plus, la MMP-9 contient un domaine *collagen-V like* qui contient une séquence riche en Sérine/Thréonine/Proline dans la région charnière. La MMP-9 humaine possède également un domaine de liaison au  $Zn^{2+}$  qui contient la séquence conservée AHGXGHXXGXXH dans laquelle trois histidines sont responsables pour la coordination de l'ion catalytique  $Zn^{2+}$ . Le domaine de liaison au  $Zn^{2+}$  et le domaine catalytique forment ensemble le site actif permettant l'activité enzymatique. Dans la proenzyme humaine, le quatrième ligand de l'ion  $Zn^{2+}$  est la cystéine en position 86 se retrouvant dans la séquence conservée PRCGXPD du prodomaine. Ce prodomaine est enlevé par plusieurs types de protéolyse ou par la liaison de substrats qui permet de libérer le site actif par un mécanisme de « *cysteine switch* » (section 1.4.4). Le domaine hémopexine est important pour la liaison de l'inhibiteur endogène de la MMP-9, le TIMP-1 (Van der Steen *et al.*, 2006).

L'activité de la MMP-9 peut-être régulée principalement par cinq mécanismes : la transcription des gènes, la sécrétion, l'activation, l'inhibition et la glycosylation (Johansson, Ahonen et Kähäri, 2000). La MMP-9 est également impliquée dans un contexte de développement tumoral et dans l'angiogénèse. Ces différents aspects seront traités dans les sections 1.5.2 et 1.5.3.

### 1.5.2 Régulation de la MMP-9

Les processus généraux de la régulation des MMPs ont été abordés dans la section 1.4.5. Par conséquent, les éléments touchés dans les sections qui suivent porteront principalement sur éléments impliqués dans la régulation de la MMP-9 spécifiquement.



### 1.5.2.1 Transcription de la MMP-9

La séquence du promoteur du gène humain de MMP-9 contient plusieurs motifs consensus pour les éléments régulateurs et ressemble davantage au promoteur des collagénases interstitielles et de stromélysine-1 qu'au promoteur de la MMP-2 (Huhtala *et al.*, 1991). Par conséquent, la régulation de la transcription de ces deux gélatinases diffère beaucoup. Le promoteur du gène de la MMP-9 contient des éléments *cis* responsable de la régulation et de l'expression de la MMP-9. Brièvement, l'activation du promoteur du gène MMP-9 dépend de l'action concertée de plusieurs facteurs *trans* mais le site de liaison AP-1 (activator protein-1) est un élément *cis* indispensable à l'expression du gène. Le promoteur du gène de MMP-9 contient au moins quatre motifs AP-1 qui peuvent interagir avec les familles de facteurs de transcription c-Fos et c-Jun. Le motif AP-1 est également connu sous le nom de TRE (*12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-responsive element*). De plus, les signaux aux sites NF- $\kappa$ B et Sp-1, deux sites qui ne se retrouvent pas dans les promoteurs des collagénases et de stromélysine-1, sont les déterminants spécifiques qui permettent l'induction de l'expression du gène MMP-9. Ce promoteur contient deux motifs NF- $\kappa$ B qui sont des prérequis pour l'expression du gène MMP-9 induite par le TNF- $\alpha$  et des motifs connus pour participer en réponse à des signaux tels de l'IL-1 $\beta$ , Bcl-2, des cytokines ou des facteurs de croissance (Van der Steen *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2001).

Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la régulation des MMPs dépendamment des stimuli, du type cellulaire et du type de MMPs. Les trois voies de signalisations des MAPKs (ERK, JNK/SAPK et p38) sont impliquées dans la régulation du gène de la MMP-9 humain et sont présentées dans la Figure 1.9 (Chakraborti *et al.*, 2003). Dans des types cellulaires spécifiques, la MMP-9 est induite par de multiples facteurs, incluant EGF, PDGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interféron (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et TGF- $\beta$ , en plus des stimulations par des esters de phorbol. Les esters de phorbol, particulièrement le PMA, miment l'activation de cascades signalétiques de certains de ces cytokines. Ils sont des analogues au diacylglycérole (DAG) et activent directement la sérine/thréonine kinase PKC (protéine kinase C). La régulation à la baisse de la MMP-9 est souvent observée suite aux effets de IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-10 puis dans certains types

cellulaires avec IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-13, EGF, PMA et TGF- $\beta$ . La combinaison de cytokines et/ou de facteurs de croissance est plus efficace pour moduler l'expression du gène MMP-9 puisque ces facteurs peuvent agir en synergie ou de manière additive (Chakraborti *et al.*, 2003; Van der Steen *et al.*, 2002).

L'expression des MMPs peut être modulée par des hormones telles les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes, la progestérone et les androgènes (Shroen et Brinckerhoff, 1996). Ces hormones sont en quelque sorte des agonistes pouvant pénétrer directement à travers les membranes cellulaires, lier spécifiquement à certains membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et réguler à la hausse ou à la baisse l'activité transcriptionnelle de gènes spécifiques aux MMPs dans différents types cellulaires. On peut induire la MMP-9 avec le triiodothyronine, l'hormone parathyroïde, le 1,25-dihydroxyvitamine D3 et les relaxines H1 et H2 (Van der Steen *et al.*, 2002). L'expression semble être inhibée par la dexaméthasone, l'acide rétinoïque tout-*trans* et la progestérone (Schroen et Brinckerhoff, 1996). La dexaméthasone empêche l'induction de la MMP-9 induite par le PMA en favorisant l'internalisation de récepteurs glucocorticoïdes du cytosol au noyau dans des fibrosarcomes, ce qui diminuerait l'activité trans de AP-1 (Cha *et al.*, 1998). De plus, la dexaméthasone peut bloquer l'induction de la MMP-9 induite par le TNF- $\alpha$  dans les cellules SCC (carcinome spinocellulaire) en ciblant NF- $\kappa$ B (Beppu, Ikebe et Shirasuna, 2002). Les effets de modulation à la baisse par les acides rétinoïques sur l'expression de MMP-9 sont attribués à une réduction de l'activité de ERK1, Est-1 et AP-1 et impliquent les sites de liaison Est-1 sur le promoteur du gène de MMP-9 (Tsang et Crowe, 2001).

Les contacts intercellulaires ou entre les cellules et la MEC peuvent également induire l'expression de la MMP-9 dans certains types cellulaires. Par exemple, les cellules endothéliales stimulent l'expression de la MMP-9 dans les monocytes et les cellules T via l'interaction ICAM-1/LFA-1. Les cellules T activées peuvent induire la MMP-9 dans les monocytes et les cellules mastiques par un contact direct intercellulaire. De plus, l'interaction de CD40 des monocytes et des cellules musculaires lisses avec le CD40 ligand des cellules T induirait l'expression de la MMP-9 des monocytes et de cellules musculaires

lisses. En plus des contacts intercellulaires, l'expression de la MMP-9 peut être induite par des contacts entre des cellules avec la MEC à l'aide d'interactions ligands-récepteurs. Ces interactions ne dépendent pas seulement de la présentation du ligand au récepteur, mais également des caractéristiques phénotypiques des cellules impliquées, comme l'activation des récepteurs, la densité des récepteurs en surface cellulaire, et/ou de la présence de voies de signalisation spécifiques couplées à des récepteurs d'adhésion. Les intégrines  $\alpha\beta$  sont les principaux récepteurs à la surface cellulaire médiant les interactions des différents composants de la MEC à la cellule. Les intégrines reconnaissent spécifiquement des séquences de protéines de la matrice, telles le motif Arg-Gly-Asp (RDG) et le segment connecteur (CS)-1 de la fibronectine ainsi que des peptides dérivés de la chaîne  $\alpha$  de la laminine. L'induction de l'expression de la MMP-9 via l'interaction des cellules avec la MEC a été observée dans quelques types cellulaires humains : collagène de type I dans les cellules de carcinomes de la prostate 32PC (via l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ ) (Dong *et al.*, 2001), le collagène de type I dans les cellules HT-1080 de fibrosarcomes et dans les fibroblastes (Muraut *et al.*, 1995); la vitronectine et la fibronectine dans cellules U266 lymphoïdes leucémiques (via l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ ) (Vacca *et al.*, 2001); collagène de type IV, fibronectine, laminine et tenascine dans les cellules THP-1 monocytiques leucémiques (via l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$ ) (Khan et Falcone, 1997); fibronectine dans les cellules HL-60 myéloïdes leucémiques (via l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ ) (Xie, Laouar et Huberman, 1998b); peptides de la laminine (AG-10 et AG-32) dans les cellules LOX de mélanomes (via l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$ ) (Nakahara *et al.*, 1996); peptide de la laminine (SIKVAV), la lectine concanavaline A et le collagène de type I dans les cellules PB monocytes (via l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ , PSGL-1 et d'autres récepteurs non identifiés) (Corcoran *et al.*, 1995). L'expression de la MMP-9 peut également être inhibée par la liaison de cellules avec la MEC. Par exemple, le collagène de type III inhibe l'expression de la MMP-9 dans les cellules de carcinomes humains 8701-BC du cancer du sein (Minafra *et al.*, 1995).

La modulation de la demi-vie de l'ARNm au niveau post-transcriptionnel est également impliquée dans la régulation de l'expression de MMP-9 en réponse à des inducteurs. Des protéines stabilisatrices de l'ARNm, telle HuR, préviennent la dégradation de certains transcrits d'ARNm et permettent l'expression accrue des protéines traduites qui

en découlent (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Le sujet de la stabilisation de l'ARNm sera abordé de façon plus détaillée dans la Section 1.5.2.6 de ce Mémoire.

#### 1.5.2.2 Sécrétion de la MMP-9

Les granulocytes-neutrophiliques sont des cellules inflammatoires qui réagissent rapidement à certains signaux d'alerte simples. Ces cellules sont impliquées dans la première ligne de défense du système immunitaire innée et agissent par phagocytose et en tuant les envahisseurs étrangers. La particularité de ces cellules consiste dans l'emmagasinement de la MMP-9 dans des granules suite à sa synthèse et qu'elles ne produisent pas de TIMPs, les inhibiteurs endogènes des MMPs. D'autres cellules inflammatoires plus spécialisées peuvent synthétiser la MMP-9 mais également la TIMP-1 *de novo*, telles les lymphocytes B et T, les monocytes, les cellules dendritiques, et les cellules *natural killer* (Van der Steen *et al.*, 2002).

Dans le cas des neutrophiles, la synthèse et l'emmagasinement de la MMP-9, sous sa forme de proenzyme, sont observés dans les stades tardifs de la différenciation myéloïde (Cowland et Borregaard, 1999). Les neutrophiles synthétisent et préemballent la MMP-9 mais ne produisent pas la MMP-2 ni la TIMP-1. Par conséquent, l'activité gélatinolytique des neutrophiles, par exemple dans la perméabilisation de la membrane basale, est principalement dépendante de la MMP-9 et est irréversible puisqu'elle ne peut être inhibée par la TIMP-1 neutrophilique (Opdenakker *et al.*, 2001). La MMP-9 contribue donc au processus irréversible de la migration leucocytaire provenant de la circulation sanguine. Cette irréversibilité a déjà été attribuée aux molécules d'adhésion (Van der Steen *et al.*, 2002). Différents stimuli endogènes et exogènes ont déjà été identifiés pour induire la dégranulation. Le stimuli exogène le plus actif est certainement le PMA, mais le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et les lipopolysaccharides bactériens peuvent induire la dégranulation de la MMP-9. Les principaux régulateurs de la dégranulation endogènes sont les facteurs chimiotactiques, tels la leucotriène B4 (LTB4), C3a et C5a dérivé du complément et, en particulier, les cytokines et les chimiokines chimiotactiques.

### 1.5.2.3 Activation de la proMMP-9

La MMP-9 est synthétisée et sécrétée sous forme de proenzyme (ou zymogène) jusqu'à ce qu'elle soit activée par le retrait du propeptide par un mécanisme de *cysteine switch* (section 1.4.4). Différentes protéases sont connues pour activer la MMP-9. Par exemple, les sérines protéases trypsines, la kallikréine tissulaire, la cathepsine G, la chymase de cellules mastiques et l'élastase des neutrophiles (Van der Steen *et al.*, 2002). Toutefois, différentes MMPs peuvent s'activer entre elles et déclencher une cascade ou plutôt, un réseau d'activation (Figure 1.8 et section 1.4.5.3). Les activateurs directs de la MMP-9 sont la matrilysine-1 (MMP-7), la matrilysine-2 (MMP-26), la collagénase de fibroblastes (MMP-1), la collagénase-3 (MMP-13), la stromyélysine-1 (MMP-3), la stromyélysine-2 (MMP-10) et la gélatinase A (MMP-2) (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999; Van der Steen *et al.*, 2002).

Deux familles de protéases sont principalement impliquées dans le déclenchement de l'activation du réseau de MMPs, soit le système de l'activateur du plasminogène/plasmine et les MT-MMPs (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999). Le plasminogène peut être converti en plasmine par l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) ou par l'urokinase (u-PA). La plasmine peut à son tour activer d'autres MMPs. Ces MMPs peuvent activer d'autres MMPs puis cette cascade aboutit finalement à l'activation de la MMP-9 qui constitue un membre terminal du réseau d'activation des MMPs. La famille des MT-MMPs contient un motif sensible à la furine dans leur propeptide et peuvent, par conséquent, possiblement être activées de manière intracellulaire (Stawowy *et al.*, 2005). Les MT-MMPs peuvent activer d'autres MMPs, par exemple la MMP-2 et la MMP-13, qui peuvent à leur tour activer la MMP-9. Le clivage protéolytique du propeptide de la MMP-9 survient en deux étapes. Il a été démontré que l'activation de la MMP-9 par la MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-13 s'effectuait premièrement par un clivage à Gln<sub>40</sub>-Met<sub>41</sub> et deuxièmement par un clivage à Arg<sub>87</sub>-Phe<sub>88</sub> (Sang, Birkedal-Hanson et Van Wart, 1995). Il est également à noter que le degré d'activité protéasique de la MMP-9 est directement proportionnel au ratio des concentrations de ses inhibiteurs (TIMPs) et ses activateurs (autres MMPs).

L'activation de la MMP-9 peut également s'effectuer avec d'autres agents, tel l'acétate 4-aminophénylmercurique (APMA) (Rosenfeldt *et al.*, 2005). Cet agent organomercurel mène à une fragmentation séquentielle du propeptide et peut induire la perte du domaine hémapexine en C-terminal en présence de calcium. D'autres agents, tels l'urée ou certains détergents, peuvent induire l'activation de la MMP-9 et agiraient probablement en perturbant l'interaction de la cystéine dans le prodomaine avec le  $Zn^{2+}$  du site catalytique. Les espèces réactives oxygénées (ROS) peuvent également activer la proMMP-9. De plus, la liaison de la proMMP-9 à la gélatine ou au collagène de type IV lui confère une certaine activité enzymatique indépendamment du clivage protéolytique du propeptide (Bannikov *et al.*, 2002).

#### 1.5.2.4 Inhibition de la MMP-9

Une fois que la MMP-9 est sécrétée ou activée, son activité peut encore être modulée soit par son inhibition fonctionnelle ou par sa dégradation. La MMP-9 est inhibée par la  $\alpha_2$ -macroglobuline, un inhibiteur universel de protéases que l'on retrouve dans le sérum humain. Toutefois, la famille des TIMPs est plus spécifique et importante dans la régulation de son activité. TIMP-1 est l'inhibiteur de haute affinité de la MMP-9 tandis que TIMP-2 et TIMP-3 sont des inhibiteurs de faible affinité pour cette protéase (Gomez *et al.*, 1997).

L'inhibition de la MMP-9 par les TIMPs suit une cinétique de liaison lente et est complexe puisque la MMP-9 possède plusieurs sites de liaison pour les TIMPs. La forme activée de la MMP-9 peut lier les TIMPs mais sa forme proenzyme peut également lier TIMP-1 et la TIMP-3 (Olson *et al.*, 1997). Des études de mutations par délétion ont montré que la liaison entre la proMMP-9 et TIMP-1 semble survenir principalement par leur domaine C-terminal. D'autre part, l'inhibition de la forme activée de MMP-9 par TIMP-1 serait due à l'interaction du domaine N-terminal de TIMP-1 et du site actif de la MMP-9 (Van der Steen *et al.*, 2002). Bref, le domaine hémapexine en C-terminal de la MMP-9 semble responsable de l'interaction de haute affinité avec la TIMP-1 avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire tandis que le domaine N-terminal semble responsable



de l'interaction de faible affinité avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire. L'interaction de la MMP-9 avec TIMP-2 est médiée par le domaine N-terminal de la MMP-9 et pas de son domaine hémapexine. Finalement, l'interaction de TIMP-3, un inhibiteur des MMPs insoluble et lié à la MEC, avec la MMP-9 et sa forme proenzyme s'effectue par leur domaine C-terminal (Van der Steen *et al.*, 2002).

#### 1.5.2.5 Autres mécanismes de régulation de la MMP-9

D'autres mécanismes de régulation de la MMP-9 ont également été élaborés. Ces mécanismes impliqueraient des protéines de surface cellulaire, telles le CD44, RECK et LRP puis des protéines de la MEC telles la chaîne  $\alpha 2(\text{IV})$  du collagène de type IV.

La MMP-9 active lie différentes isoformes de CD44 à la surface cellulaire (Yu et Stamenkovic, 1999). CD44 est le récepteur membranaire de l'acide hyaluronique et son expression est corrélée à un haut potentiel invasif des cellules cancéreuses (Jothy, 2003). L'interaction de CD44 et de la forme active de MMP-9 permettrait à la cellule de localiser son activité protéolytique afin d'éviter des activités protéolytiques indésirables à des sites distants (Hu et Ivashkiv, 2006). De plus, l'association de CD44 avec la forme active de MMP-9 permet l'activation de la forme latente du TGF- $\beta$ , une cytokine multifonctionnelle impliquée dans le remodelage de la MEC, l'angiogénèse et la progression tumorale (Yu et Stamenkovic, 2000).

RECK (*reversion-induced-cystein-rich-protein with kazal motifs*) est une glycoprotéine membranaire contenant des domaines homologues aux inhibiteurs de sérine protéases et s'associe à la membrane cellulaire par l'ancre  $\beta_2$ -glycoprotéine (Weaver, 2002). RECK est exprimé dans un grand nombre de tissus humains et son expression est diminuée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales. Des études ont montré que RECK pouvait réprimer la synthèse, la sécrétion et l'activation de la MMP-9 et influencer l'intégrité de la MEC (Simizu *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 1998). De plus, l'expression de RECK dans les tumeurs peut réprimer la progression tumorale *in vivo* en inhibant l'angiogénèse (Oh *et al.*, 2001).



La LRP (*low density lipoprotein receptor-associated protein*) est un récepteur cellulaire permettant l'internalisation et la dégradation rapide de la MMP-9 (Herz et Strickland, 2001). Ce récepteur permet également l'internalisation de certaines protéines extracellulaires telles les lipoprotéines, les complexes de protéases avec leurs inhibiteurs, les facteurs de croissance, les composants de la MEC, les virus et les toxines bactériennes (Strickland, Medved, 2006; Schneider et Nimpf, 2003). Une étude *in vitro* montre que la quantité de MMP-9 dans les milieux conditionnés de fibroblastes augmente en présence de l'antagoniste pour la liaison de ligands à LRP, le 39-kDa RAP (*Receptor Associated Protein*) (Hahn-Dantona *et al.*, 2001). De plus, les lignées cellulaires exprimant LRP peuvent médier l'internalisation des complexes MMP-9/TIMP-1 radiomarqués contrairement aux cellules génétiquement déficientes en LRP (Hahn-Dantona *et al.*, 2001).

La proMMP-9 contient un domaine « *fibronectin-like* » pouvant lier plusieurs composantes de la MEC, dont la gélatine. Ce domaine permet à la proMMP-9 d'interagir avec les molécules de collagène de la MEC. Des études ont montré que la proMMP-9 se retrouvait à la membrane cellulaire et aux contacts focaux de cellules endothéliales. La proMMP-9 a également été retrouvée à la membrane plasmique des cellules HT-1080, de fibrosarcome humain, puis la proenzyme pouvait être activée par un mécanisme dépendant de la plasmine (Partridge *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que la chaîne  $\alpha 2(\text{IV})$ , provenant du collagène de type IV, était une protéine de surface cellulaire qui possède une haute affinité pour la proMMP-9 (Kd environ 22 nM) et qui permet de former un complexe avec TIMP-1 (Olson *et al.*, 1998). Ces études suggèrent que l'interaction de la proMMP-9 avec la chaîne  $\alpha 2(\text{IV})$  en surface cellulaire joue un rôle dans la localisation du proenzyme ciblant la région de contact entre la cellule et la MEC et serait impliquée dans la dégradation de la membrane basale.

#### **1.5.2.6 HUR, un facteur nucléaire stabilisateur de l'ARNm de la MMP-9**

##### *Généralités*

La régulation de la stabilité et de la traduction de l'ARNm est essentielle dans le contrôle de l'expression des protéines. La régulation de ces deux processus permet à la

cellule de répondre rapidement aux changements intracellulaires et aux stimuli extracellulaires. Plusieurs facteurs nucléaires et cytoplasmiques peuvent contrôler la demi-vie de certains ARNm soit en stimulant ou en inhibant sa dégradation. Dans les cellules de mammifères, des éléments de séquence riches en adénosine et en uridine, appelé AREs (*AU-rich elements*), ont été identifiés pour leur capacité à cibler l'ARNm de l'hôte vers une dégradation rapide. En général, ces ARNm codent pour des protéines qui sont impliquées soit dans la croissance cellulaire, soit dans la réponse d'un organe à des facteurs externes tels des micro-organismes, l'inflammation ou des facteurs environnementaux (Guhaniyogi et Brewer, 2001). Ces gènes requièrent donc une régulation très serrée dans le temps et dans l'espace de leur expression et qui est obtenue, en plus des mécanismes de contrôle transcriptionnels, par la régulation de la translation et de la stabilité de ces ARNm. Plusieurs conditions pathologiques ont été associées à une dérégulation de la stabilité de ces ARNm, tels dans les cancers, l'inflammation chronique et dans les pathologies auto-immunes (Gingerich, Feige et LaMarre, 2004; Audic et Hartley, 2004).

Les AREs sont des éléments d'environ 50-150 nucléotides qui sont localisés dans la région non traduite à l'extrémité 3' (UTR-3', *untranslated region*) de plusieurs ARNm qui possèdent une courte demi-vie (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Ces éléments sont généralement associés à leur capacité de provoquer la dégradation rapide de ces ARNm par un mécanisme dépendant de la déadénylation (raccourcissement de la queue polyA) (Chen et Shyu, 1995). Les AREs sont catégorisés en trois classes selon la quantité et la distribution des pentamères AUUUA. La classe I contient plusieurs copies dispersées du motif AUUUA à l'intérieur des régions riches en uridine. La classe II possède au moins deux nanomères UUAUUUA(U/A)(U/A) qui se chevauchent. Les AREs de la classe III sont moins bien définis et possèdent des régions riches en uridine mais ne contiennent pas de motif AUUUA (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Par contre, il est nécessaire de noter qu'aucune séquence consensus n'a été trouvée à ce jour pour définir précisément chacune des classes de AREs. De plus, cette classification de AREs n'est pas basée sur les protéines auxquelles elles s'associent ni par leur fonctions biologiques. Il est intéressant de soulever que la majorité des ARNm de la classe II encode pour les cytokines tandis que les ARNm de la

classes I, et occasionnellement de la classe III, encodent principalement pour des facteurs de transcription et des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

#### *Les ARE-BPs*

Les ARE-BPs (*AU-rich binding proteins*) sont des protéines cellulaires régulatrices de la stabilité de l'ARNm. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de la stabilité des proto-oncogènes et des cytokines. Des changements dans les niveaux d'expression de certaines ARE-BPs sont associées au développement de certains cancers (Audic et Hartley, 2004). Plusieurs ARE-BPs ont déjà été répertoriées et certains de leurs effets sur la stabilité et la traduction des ARNm contenant des ARE ont été soulevés (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Un bilan partiel des ARE-BPs identifiées et de leurs effets sur l'ARNm ciblé sont représentés dans le Tableau 1.4. Il est également intéressant de noter que plusieurs ARE-BPs peuvent lier une même séquence d'ARNm et que ces associations pourraient moduler l'expression des ARNm. Par exemple, il a été montré que l'association de l'ARNm de p21 ou de la cycline D1 avec HuR entraînait la stabilisation et la traduction du transcrit via les polysomes puis l'expression des protéines tandis que l'association ARNm avec AUF1 induisait la dégradation du transcrit via un complexe macromoléculaire appelé exosome agissant comme une RNase qui mène ultimement à la perte de l'expression protéique (Lal *et al.*, 2004).

#### *HuR*

HuR fait partie de la superfamille de protéines ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*)-like. Cette famille est constituée de quatre membres : HuD, HuC, Hel-N1 et HuR (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Les protéines HuD, HuC et Hel-N1 sont exprimées sélectivement dans les neurones puis Hel-N1 est retrouvée également dans les gonades. HuR est une protéine exprimée ubiquitairement et est l'une des ARE-BPs les plus étudiées (Barreau, Paillard et Osborne, 2005). Il a été montré que HuR est impliqué dans la stabilisation du transcrit de VEGF (Levy, 1998). HuR lie également spécifiquement les AREs, localisés dans la région UTR-3' des ARNm qui codent pour les protéines impliquées dans la croissance cellulaire, telles c-Fos, c-myc, cycline A, cycline B1 et NOS II (Barreau,

Paillard et Osborne, 2005). De plus, il semble que HuR module l'expression de plusieurs autres ARNm spécifiques aux cytokines et aux facteurs de croissance. HuR est principalement localisée dans le noyau mais peut être transloquée dans le cytoplasme (Fan et Steitz, 1998). Ce phénomène de navette pourrait avoir un rôle fonctionnel puisqu'il a été montré que HuR sert d'adaptateur pour l'exportation du noyau de l'ARNm de c-fos, un ARE de classe I (Gallouzi et Steitz, 2001). Bien qu'aucune mutation de HuR n'a été retrouvée dans le cancer, il a été suggéré qu'il existe un lien entre HuR et la transformation maligne dans les cancers du sein, du colôn, du poumon et des ovaires (Lopez de Silanes, Lal et Gorospe, 2005).

#### *HuR et MMP-9*

Des études récentes ont démontré que HuR était également impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de la MMP-9. Une de ces études montre que la MMP-9 possède plusieurs motifs AREs dans sa région UTR-3' (Akool *et al.*, 2003). Des mutations dans chacun de ces éléments inhibent fortement la liaison de l'ARN avec HuR lors de la formation du complexe. Cette étude suggère que l'amplification de l'expression de la MMP-9 induite par l'interleukine-1 $\beta$  impliquerait une augmentation de la stabilité de l'ARNm de la MMP-9 dépendante de HuR (Huwiler *et al.*, 2003). Une autre étude montre que l'oxyde nitrique (NO) augmente la dégradation de l'ARNm de la MMP-9 par l'inhibition de l'expression de HuR (Akool *et al.*, 2003).

#### **1.5.3 Rôles de MMP-9 dans diverses pathologies**

La MMP-9 est impliquée dans plusieurs conditions pathologiques. Des mécanismes de régulation défaillants de la MMP-9 mènent à la production excessive ou insuffisante de cette protéase puis subséquemment à une dégradation augmentée, diminuée ou inadéquatement programmée de la MEC (Van der Steen *et al.*, 2002). Par exemple, la dérégulation de la MMP-9 est observée dans la rupture prématurée des membranes amniotiques (Vadillo-Ortega *et al.*, 1996) et dans la pathologie de la résorption osseuse (Ueda *et al.*, 1996). La perte de contrôle des mécanismes de régulation de la MMP-9 est également observée dans les maladies inflammatoires (blessures chroniques, inflammation

de la peau, du tractus pulmonaire, du tractus gastrointestinal, du tractus rénal, des jointures, des vaisseaux sanguins, du système nerveux), infectieuses, vasculaires, dégénératives et malignes (cancers) (Van der Steen *et al.*, 2002).

La MMP-9 a été impliquée dans l'invasion cellulaire tumorale et dans la métastase due à son habileté à dégrader les constituants de la membrane basale et de l'endothélium vasculaire. Les différentes MMPs participent à plusieurs étapes de la progression tumorale, incluant l'invasion, la métastase et l'angiogénèse. De plus, dans ce Mémoire l'emphasis sera mise sur les cellules qui produisent la MMP-9 (stromales ou tumorales), sur la corrélation entre les niveaux de MMP-9 et les grades histologiques de certaines tumeurs, et sur le rôle de la MMP-9 dans l'angiogénèse qui permet la croissance et l'invasion tumorale puis la métastase.

Une augmentation de l'expression de la MMP-9 a été décrite dans les fluides céphalorachidiens de patients atteints de tumeurs cérébrales, de cancer de la vessie, dans les cellules basales et squameuses des cancers de la peau, les lésions malignes des pigments de la peau, les carcinomes spinocellulaires des poumons, les carcinomes du sein et du côlon, les carcinomes endométriaux, le cancer des ovaires, le carcinome de la prostate, le cancer de la prostate et dans le cancer gastrique (Van der Steen *et al.*, 2002). De plus, l'expression de la MMP-9 est corrélée avec le grade histologique de lymphomes malins humains et avec l'agressivité des adénocarcinomes prostatiques, du cancer gastrique, des gliomes et de la malignité du cancer de la vessie (Deryugina et Quigley, 2006). Dans le cancer de la vessie, et dans plusieurs autres cancers mentionnés ci-haut, l'expression de la MMP-9 n'est pas nécessairement restreinte aux cellules tumorales. Son expression peut également être retrouvée dans les cellules stromales environnantes et dans les cellules inflammatoires originaires de l'hôte, spécialement à l'interface tumeurs-stroma et principalement dans les cellules stromales les plus proches du front de l'invasion. On détecte souvent une diminution de la protéase avec l'augmentation de la distance de la tumeur (Deryugina et Quigley, 2006).

Hormis le processus d'invasion des tissus environnants et de métastase, l'angiogénèse est un processus crucial dans la croissance tumorale. La capacité des tumeurs



primaires et métastasées de croître en grosseur au-delà des limites de diffusion d'oxygène requière l'établissement d'une néovascularisation. En effet, les tumeurs métastatiques de croissance rapide et hautement invasives nécessitent plus de vaisseaux pour leur convier les nutriments et l'oxygène et pour éliminer les catabolites. Le processus d'angiogénèse implique la migration de cellules endothéliales stimulées et la formation subséquente de tubes et dépend d'un contrôle protéolytique serré des composants de la MEC. Comme dans les conditions physiologiques, l'angiogénèse *in vitro* est modulée, en partie, par la MMP-9 (Gondi *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2005). Il a été montré que la MMP-9 est importante dans la morphogénèse de cellules endothéliales vasculaires puisqu'elle mène à la formation de structure organisée, observée par la formation de tubes *in vitro* (Jadhav *et al.*, 2004). Dans le carcinome endométrial, il a été montré que l'angiogénèse et l'expression de l'ARNm de MMP-9 survenaient simultanément (Aglund *et al.*, 2004; Ria *et al.*, 2002). De plus, l'expression de la MMP-9 est restreinte aux cellules lisses et dans les péricytes perivasculaires à la limite proliférative des gliomes (Wang, Anderson et Gladson, 2005; Van Hinsbergh, Engelse et Quax, 2006). Ces résultats mettent de l'avant l'importance de la MMP-9 dans les processus angiogéniques. Finalement, l'inhibition par des agents synthétiques de la MMP-9 prévient la croissance et l'invasion à partir de cibles tumorales anti-angiogéniques et anti-invasives (Gondi *et al.*, 2004).

## **1.6 Approches thérapeutiques contre le cancer**

### **1.6.1 Généralités**

Le type d'intervention favorisé pour le traitement des cancers métastasés dépend du tissu originaire du néoplasme primaire, du stade de la tumeur et de l'état général de la maladie. Présentement, trois interventions sont préconisées pour le traitement du cancer, soit la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (WCR, 2003). Ces interventions ont pour but d'obtenir une rémission de la maladie, c'est-à-dire une régression de la tumeur cancéreuse et, si possible, sa disparition clinique.

Les traitements peuvent être locaux, systémiques ou la combinaison des deux. Les traitements locaux, tels la chirurgie et la radiothérapie, sont privilégiés lorsque la tumeur est

bénigne et de petite taille (Kreutzer et Fahlbusch, 2004; Gittoes, 2003). La chirurgie consiste à éradiquer la tumeur primaire ainsi que les lésions présentes dans les ganglions lymphatiques régionaux. La radiothérapie consiste à détruire les cellules tumorales en bloquant leur capacité à se multiplier par l'exposition de rayons ionisants (rayon X, électrons, photons). L'efficacité de l'irradiation varie selon les tissus et le type cellulaire. La radiothérapie est souvent employée conjointement avec la chirurgie soit pour réduire la masse tumorale avant l'opération ou pour empêcher la récurrence du cancer suite à l'excision de la masse tumorale. La chirurgie et la radiothérapie sont souvent les traitements associés à la rémission d'un cancer.

La chimiothérapie est un traitement systémique qui est privilégié dans les tumeurs malignes et métastasées à des sites distants. La chimiothérapie est souvent utilisée pour traiter des tumeurs malignes pédiatriques, des tumeurs de cellules germinales et certains types de lymphomes (Pearson, 2002; Lemarie, 2004; Fuchs, Diehl et Re, 2006; Omuro et Abrey, 2006). Elle peut être administrée avant la chirurgie pour faciliter la résection et pour empêcher l'apparition de métastases, ou après une chirurgie pour réduire le risque de récurrence à long terme. La majorité des médicaments en chimiothérapie peuvent se subdiviser en : agents alkylants, anti-métabolites, alcaloïdes végétaux, inhibiteurs de la topoisomérase et antibiotiques antitumoraux (Allain, 2000). Tous ces médicaments affectent à un certain point la mitose ou la synthèse et la fonction de l'ADN (Allain, 2000). D'autres médicaments modifient le comportement des cellules tumorales sans autant attaquer directement les cellules, on utilise notamment des hormones pour ce genre de thérapie adjuvante. De plus, la thérapie génique et certaines stratégies inédites d'immunothérapie font partie des nouvelles approches, mais les résultats cliniques obtenus jusqu'à présent sont décevants (McCarron *et al.*, 2005; Parmiani *et al.*, 2007). Les médicaments de chimiothérapie sont typiquement cytotoxiques et sont souvent liés à une pharmacorésistance et plusieurs effets secondaires (Di Paolo et Bocci, 2007; Higdon et Higdon, 2006; Perez-Thomas, 2006). De plus, les traitements de chimiothérapie modernes utilisent généralement un mélange de ces médicaments pour optimiser leurs effets anti-cancéreux.



### 1.6.2 Le PCK3145

La PSP94 (*prostate secretory protein 94*) est une protéine composée de 94 acides aminés, riche en cystéine et non-glycolysée qui a initialement été découverte comme étant une hormone pouvant réduire les niveaux de FSH (*follicule-stimulating hormone*) en circulation sanguine (Mundle et Sheth, 1991). Il est maintenant bien établi que la PSP94 est l'une des trois protéines prédominantes sécrétées par la glande de la prostate en compagnie de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et de la phosphatase acide prostatique (PAP) (Abrahamsson et Lilja, 1990). La PSP94 est également retrouvée sous l'appellation de  $\beta$ -microsémipoprotéine ou PIP (*prostatic inhibin peptide*). Depuis sa découverte, il a été montré que la PSP94 est produite dans d'autres organes que la prostate, surtout dans les tissus reproducteurs féminins, tels les seins et les ovaires (Baijal-Gupta *et al.*, 2000). Toutefois, en comparant avec d'autres tissus, l'expression de la PSP94 est supérieure dans les glandes de la prostate (Baijal-Gupta *et al.*, 2000). L'expression de la PSP94 est également différencielle selon le stade du cancer de la prostate. Son niveau d'expression dans l'épithélium normal de la prostate est élevé mais diminue progressivement avec la progression d'un cancer, du cancer de la prostate au stade précoce, peu invasif et dépendant de l'androgène, au stade tardif, hautement invasif et indépendant de l'androgène, jusqu'à la perte totale de l'expression de la PSP94 dans un cancer de la prostate hautement avancé (Zhang *et al.*, 1999; Tsurusaki *et al.*, 1998). Par conséquent, son expression différentielle et du fait qu'elle soit indépendante de l'androgène, contrairement à la PSA et la PAP, la PSP94 s'avère intéressante pour le développement d'un marqueur pronostique ainsi qu'un agent thérapeutique chez les patients atteints du cancer de la prostate (Sakai *et al.*, 1999).

Plusieurs fonctions ont été attribuées à la PSP94. Elle est un modulateur des niveaux de FSH dans la circulation sanguine, une hormone contrôlée par la glande hypophyse qui gouverne les fonctions reproductives mâles et femelles (Chao *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1996). La PSP94 agit également, dans un contexte tumoral, comme inhibiteur de la croissance cellulaire épithéliale, inducteur de l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate *in vivo* et *in vitro* (Garde *et al.*, 1999; Shukeir *et al.*, 2005), régulateur des niveaux de calcium plasmatique lors d'une hypercalcémie associée aux cancers malins (Shukeir *et*

*al.*, 2003) et retarde la progression de métastases squelettiques dans des modèles *in vivo* murins (Shukeir *et al.*, 2004).

Le PCK3145 est un peptide synthétique de 15 acides aminés, pesant 1825 Da et ayant un point isoélectrique de 3.5. Sa séquence est dérivée de la protéine native PSP-94 et comprend les acides aminés 31 à 45 de celle-ci: EWQTDNCETCTCYET (Figure 1.10). Plusieurs autres peptides ont été générés à partir de la séquence de la PSP-94 mais seul le PCK3145 réussit à transduire les effets anti-tumoraux de la protéine native, autant *in vivo* que *in vitro* (Shukeir *et al.*, 2004). En effet, il a été rapporté lors du congrès de l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO) en 2004 que le PCK3145, un agent thérapeutique dirigé contre le cancer de la prostate avancé et métastasé, a engendré des résultats positifs de l'essai clinique de phase IIa. Les résultats finaux confirment l'innocuité, la tolérabilité et l'efficacité préliminaire du PCK3145 pour l'ensemble des doses évaluées (Hawkins *et al.*, 2005). Une fois l'étude complétée, dix patients sur seize présentaient une maladie stabilisée, cinq patients présentaient une progression de la maladie et une réponse partielle a été observée chez un patient après deux cycles de traitement (Hawkins *et al.*, 2005). Les résultats les plus significatifs ont été observés au niveau de la réduction des niveaux plasmatiques de MMP-9, un marqueur tumorale dans cette étude, chez l'ensemble des patients présentant des concentrations élevées avant le traitement (Hawkins *et al.*, 2005). La réduction des niveaux de MMP-9 par le PCK3145 suggère qu'il est potentiellement impliqué dans la régulation de la croissance des tumeurs métastatiques. Les études de phase I/IIa maintenant complétées, le PCK3145 est présentement sujet à des études de phase IIb chez des patients atteints de cancer de la prostate réfractaire aux hormones (HRPC).

Tout comme le PSP94, plusieurs fonctions anti-cancéreuses ont été attribuées au PCK3145. Le PCK3145 réduit la progression tumorale et le développement métastatique dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer de la prostate (Shukeir *et al.*, 2005). De plus, puisque les essais cliniques de phase I/IIa montrent que le PCK3145 peut diminuer les niveaux plasmatiques de la MMP-9 chez les patients HRPC, des études ont investigué les mécanismes moléculaires du PCK3145 dans la néovascularisation tumorale. Dans des modèles syngéniques murins de cancer de la prostate, le PCK3145 inhibe de 43%

l'expression de CD31 dans les tumeurs primaires, un marqueur de cellules endothéliales permettant d'évaluer la densité vasculaire tumorale (Lamy *et al.*, 2006). Dans cette même étude, le PCK3145 inhibe la phosphorylation de ERK induite par le VEGF, un puissant facteur pro-angiogénique, ainsi que la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 dans les cellules endothéliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) *in vitro* (Lamy *et al.*, 2006). Ces effets anti-VEGF du PCK3145 sont comparables aux effets observés par des inhibiteurs pharmacologiques de ERK et de VEGFR-2, respectivement le PD98059 et le PTK787, suggérant que le PCK3145 inhibe l'activité tyrosine kinase associée à VEGFR-2 empêchant ainsi la transduction de signaux intracellulaires via la voie des MAPK. Le PCK3145 inhibe également la phosphorylation de ERK et du récepteur PDGFR médiées par le PDGF dans les cellules musculaires lisses PASM (Pulmonary Aortic Smooth Muscle Cells) (Lamy *et al.*, 2006), des cellules impliquées dans la stabilisation de nouveaux vaisseaux sanguins (Hirschi, Rohovsky et D'Amore, 1998; Carmeliet, 2000). Enfin, le PCK3145 inhibe la formation de structures tubulaires dans les cellules endothéliales *in vitro* (Lamy *et al.*, 2006).

Nous avons constaté que la séquence peptidique du PCK3145 partage, à un certain égard, des homologies de structure avec différentes chaînes précurseurs de la laminine. Ces résultats ne sont pas publiés mais ces homologies de structures entre la séquence du PCK3145 et les chaînes  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  de la laminine sont illustrées dans la Figure 1.11.

Enfin, notre laboratoire a montré, dans des études *in vitro*, que le PCK3145 exerce un contrôle moléculaire double sur les fonctions de la MMP-9 en inhibant la sécrétion de MMP-9 ainsi que son ancrage à la surface cellulaire. La protéolyse de CD44, modulée par RhoA/MT1-MMP, induite par le PCK3145 inhiberait l'interaction CD44/MMP-9 à la surface cellulaire (Annabi *et al.*, 2006). Ceci permettrait de diminuer la dégradation de la MEC associée aux tumeurs et de limiter les processus d'invasion tumorale subséquents. L'utilisation de peptides dans les traitements contre le cancer est donc particulièrement intéressante puisqu'ils peuvent être facilement synthétisables à un coût moindre, ils possèdent une bonne perméabilité tissulaire et ils peuvent être conjugués à des agents chimiothérapeutiques pour éviter les effets secondaires cytotoxiques tout en ciblant

adéquatement les tissus d'intérêts (Lien et Lowman, 2003; Aina *et al.*, 2002; Schally et Nagy, 1999).

### 1.6.3 Le thé vert

Historiquement, le thé vert est consommé par les populations Chinoises et Japonaises depuis plusieurs siècles et est reconnu pour ses propriétés médicinales. Les effets bénéfiques du thé vert sont attribuables aux composés polyphénoliques, particulièrement aux catéchines, qui représente 30% du poids sec des feuilles du thé vert (Zaveri, 2006). Les cathéchines sont les principaux polyphénols et composés actifs du thé vert, desquels l'(-) épigallocatechine gallate (EGCg) est la plus abondante et la plus étudiée (Figure 1.12).

Le thé vert et ses constituants sont mieux connus pour leurs propriétés antioxydantes qui a mené à leur évaluation dans plusieurs maladies associées aux espèces oxygénées réactives (ROS), telles dans les cancers et dans les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Cooper, Morre et Morre, 2005a). Il a été montré que le thé vert est hypocholestérolémique et qu'il prévient le développement de plaques athérosclérotiques (Yang et Koo, 2000; Chyu *et al.*, 2004). Dans les pathologies associées à l'âge et les maladies neurodégénératives, le thé vert conférerait une protection significative contre la maladie de Parkinson, l'Alzheimer et les dommages ischémiques (Mandel et Youdim, 2004). Il a également été montré que le thé vert possède des effets anti-diabétogènes (Wu *et al.*, 2004), anti-bactériens (Stapleton *et al.*, 2004), anti-HIV (Nance et Shearer, 2003) et des activités anti-inflammatoires (Dona *et al.*, 2003). Cependant, la grande majorité des recherches sur le thé vert focalise sur son rôle dans le traitement du cancer.

Plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études dans les modèles animaux montrent que le thé vert possède des propriétés bénéfiques contre plusieurs cancers, tels le cancer du sein, du côlon, du poumon, de l'oesophage, de l'estomac, du foie, du duodénum, du petit intestin, du pancréas, de la prostate, de la vessie et de la peau (Cooper, Morre et Morre, 2005b; Zaveri, 2006). En plus de posséder des propriétés chimiopréventives contre le cancer, les catéchines du thé vert sont des agents anti-angiogéniques qui préviennent la

néovasularisation tumorale (Pfeffer *et al.*, 2003) et des agents anti-mutagéniques (Han, 1997).

Les études dans les modèles animaux ont démontré que le thé vert et l'EGCg pouvaient inhiber la cancérogenèse à toutes les étapes, c'est-à-dire dans l'initiation, la promotion et la progression (Chung *et al.*, 2003). L'inhibition multifactorielle des processus tumoraux est attribuée, en grande partie, à la combinaison des effets antioxydants, anti-prolifératifs et pro-apoptiques du thé vert. Les modèles animaux montrent que le thé vert et l'EGCg inhibent les processus angiogéniques, d'invasion et de métastase tumorale (Fassina *et al.*, 2004; Oak, El Bedoui et Schini-Kerth, 2005). Les résultats convaincants des effets chimiopréventifs du thé vert contre le cancer ont sûrement poussé le *National Cancer Institute* (NCI) à effectuer des études cliniques. Le POLYPHENON E, un mélange de composés extraits du thé vert, fait présentement l'objet d'étude clinique de phase II (Chow *et al.*, 2005; Thomasset *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2001).

#### 1.6.4 Les modèles cellulaires utilisés

L'objectif de nos recherches est de comprendre le rôle du récepteur de la laminine à 67 kDa (67LR) dans la régulation des mécanismes de sécrétion de la MMP-9. Nous avons donc utilisé des lignées cellulaires dans lesquelles l'expression de la MMP-9 et du 67LR étaient constitutives ou pouvaient y être induites. Pour ces raisons, nous avons sélectionné les lignées cellulaires HT-1080 et HL-60 pour effectuer notre expérimentation.

Nous avons utilisé les HT-1080 dans les deux premiers volets de notre recherche pour l'étude des propriétés anti-métastatiques du PCK3145. Les HT-1080 sont des cellules de fibrosarcomes humaines qui expriment constitutivement la MMP-9. De plus, il a déjà été rapporté que l'expression de la MMP-9 dans ces cellules peut être induite par, entre autre, des traitements au PMA ou au TNF- $\alpha$  (Annabi *et al.*, 2005). De plus, une étude montre que la confluence de ces cellules corrèle directement avec le niveau d'expression du 67LR (Donaldson *et al.*, 2000). Également, les HT-1080 sont des cellules stables pouvant facilement être transfectées (Annabi *et al.*, 2005).

Nous avons utilisé la lignée cellulaire HL-60 dans le troisième volet de notre recherche afin d'évaluer les propriétés anti-métastatiques des catéchines du thé vert. Les HL-60 sont des cellules promyélocytaires leucémiques humaines. Ce modèle cellulaire a longuement servi dans la compréhension du processus par lequel les cellules immatures se différencient en une lignée cellulaire myélomonocytaire mature distincte (Collins *et al.*, 1978). Les cellules HL-60 peuvent être différenciées en macrophages par des agents promoteurs de tumeurs (Huberman et Callahan, 1979), particulièrement par le PMA, via un processus de transduction de signal dans lequel la PKC- $\beta$  joue un rôle essentiel comme site de liaison du PMA (Tonetti *et al.*, 1994). Il a été montré que la différenciation macrophagique implique la sécrétion et l'activation de la MMP-9 (Xie, Laouar et Huberman, 1998b). De plus, il a été montré que l'expression du 67LR module l'adhésion de cellules myéloïdes aigues leucémiques à la laminine et qu'elle est fréquemment associée avec la différenciation monocytique (Montuori *et al.*, 1999). Finalement, la réponse inflammatoire modulée par les macrophages associés aux tumeurs est un aspect important impliqué dans l'inflammation et la progression tumorale (Bingle, Brown et Lewis, 2002; Lewis et Pollard, 2006).

### 1.7 Buts de la recherche

Le développement et la progression des cancers sont des processus complexes impliquant l'interaction des cellules cancéreuses avec la MEC. La dégradation et le remodelage de la MEC par les MMPs sont des événements cruciaux impliqués dans les processus angiogéniques et métastatiques tumoraux. La laminine, une composante majeure de la membrane basale et de la MEC, joue un rôle central dans les processus de croissance, de différenciation et de migration cellulaire. L'expression du 67LR, un récepteur membranaire spécifique à la laminine, est souvent corrélée avec le degré de malignité et la tendance à métastaser des cellules cancéreuses. De plus, l'expression du 67LR est associée à la différenciation monocytiques et à plusieurs leucémies. Par conséquent, l'habileté de moduler l'expression de la MMP-9 à des étapes multiples lors de la progression tumorale par des voies de signalisation distinctes pourrait s'avérer particulièrement importante lors de la conversion maligne et la métastase; les cellules tumorales doivent induire ou maintenir les niveaux de MMP-9 suite à des signaux environnementaux, tels des interactions entre des cellules et la MEC. La plupart des études focalisent sur le contrôle transcriptionnel de la MMP-9. Toutefois, de plus en plus de données suggèrent que son expression peut également être régulée à l'étape de la stabilisation de l'ARNm, de sa traduction et de la sécrétion de la protéine.

Notre recherche s'intéresse donc à l'implication du 67LR et de HuR, une protéine nucléaire stabilisatrice de l'ARNm de la MMP-9, dans la régulation des fonctions de la MMP-9 par les agents anti-tumoraux, le PCK3145 et les catéchines du thé vert. La compréhension des mécanismes d'action par lesquels le PCK3145 et les catéchines gallates inhibent la sécrétion de la MMP-9 et l'identification du 67LR et de HuR comme des facteurs touchés par ces agents anti-tumoraux permettraient alors de développer des avenues thérapeutiques plus ciblées et efficaces contre certains types de cancers.



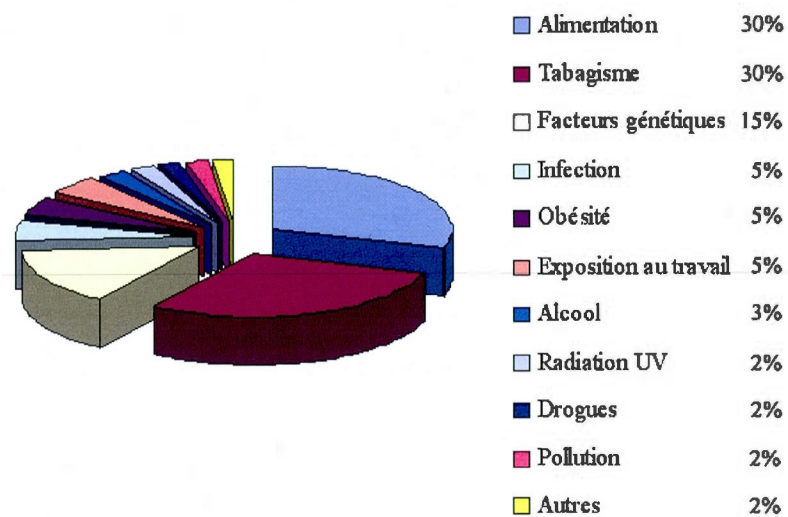


Figure 1.1: Les facteurs de risque du cancer. L'alimentation et le tabagisme sont les facteurs de risques principaux associés au développement du cancer. Chacun représente environ le tiers de ces facteurs. (Adaptée du WCR, 2003)

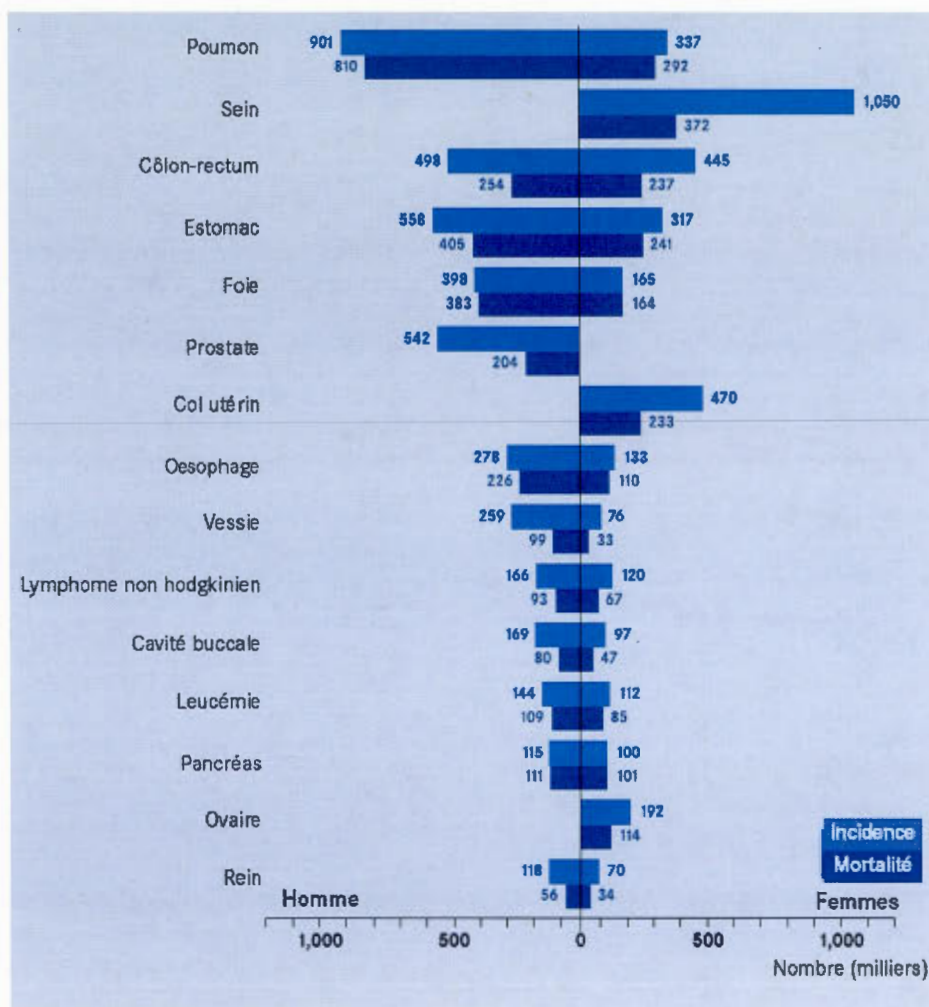


Figure 1.2: Les incidences et mortalités des cancers les plus répandus dans le monde.  
(Adaptée du WCR, 2003)

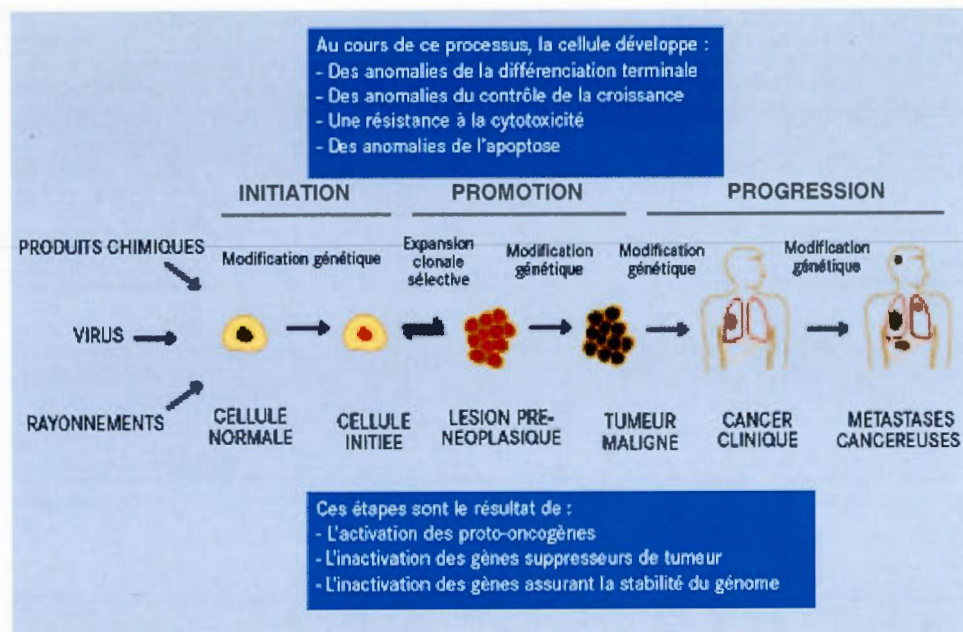


Figure 1.3: Les grandes étapes d'initiation, de promotion et de progression de la cancérogenèse multi-étapes. (Adaptée du WCR, 2003)

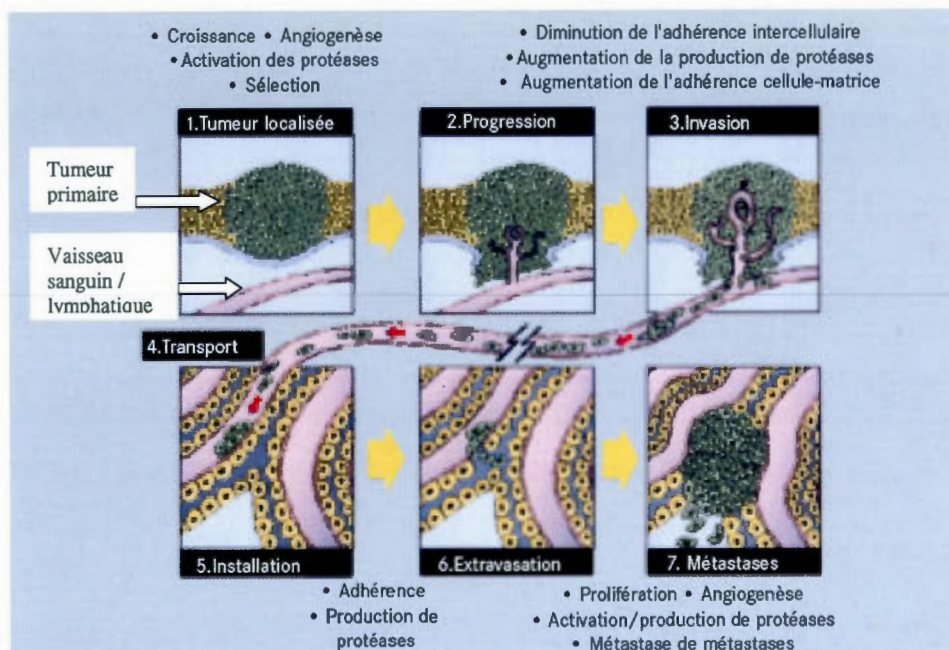


Figure 1.4: Les grandes étapes du processus métastatique. Les cellules invasives de la tumeur primaire, dégradent la membrane basale délimitant le tissu, progressent par l'invasion des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ces cellules tumorales provenant de la tumeur primaire peuvent ensuite s'ancrer à des sites distants, extravaser dans le tissu secondaire en dégradant la membrane basale et envahir le tissu secondaire pour former des métastases. (Adaptée du WCR, 2003)

Tableau 1.1 :Inhibiteurs et activateurs endogènes modulant l'angiogénèse tumorale

Inhibiteurs	Activateurs
Angiostatine	Facteur de croissance transformant
	Angiogénine
Récepteur du facteur de croissance fibroblastique basique	Angiopoïétine
Endostatine	Angiotropine
Interféron-alpha	Facteur de croissance fibroblastique
Interleukine 1, 6 et 12	Facteur stimulateur des granulocytes
Protéine reliée à la proliférine placentaire	Facteur de croissance hépatique
Facteur plaquettaire 4	Interleukine 8
Prolactine	Métalloprotéinases de la matrice
	Facteur de croissance placentaire
Thrombospondine	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs)	Proliférine
Facteur de croissance transformant-beta	Facteur de croissance tumoral (TNF-alpha)
	VEGF

(Adapté de Sridhar et Shepherd, 2003)

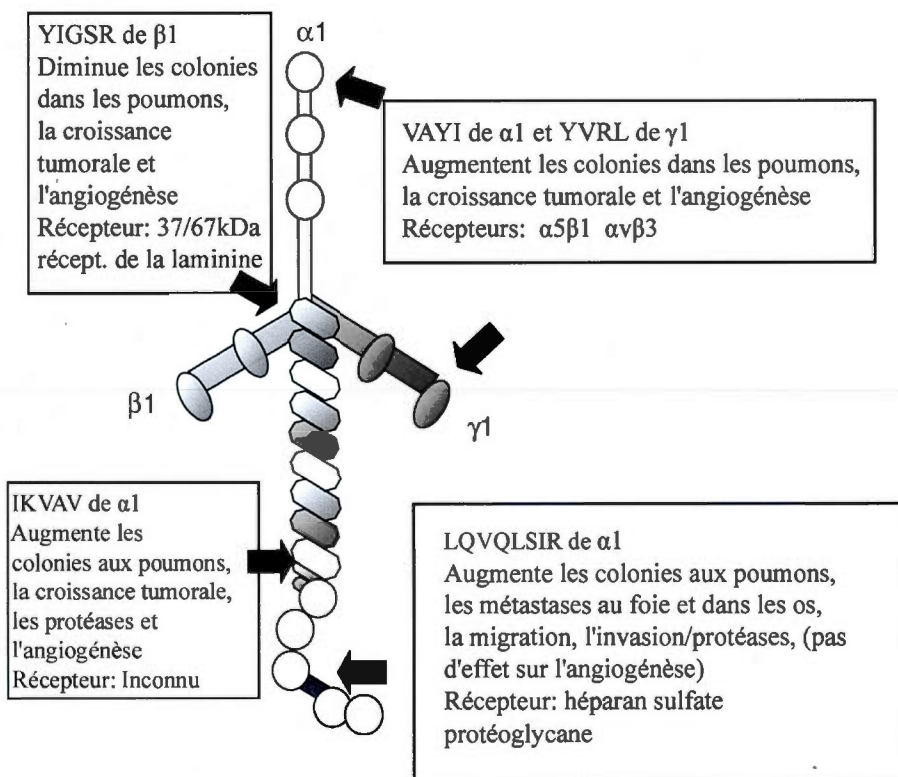


Figure 1.5 : Schéma de certains sites actifs de la laminine-1 impliqués dans la modulation de l'adhésion cellulaire, la migration, l'activité des protéases, la prolifération, la croissance tumorale, l'angiogénèse et la métastase. (Adaptée de Engbring et Kleinman, 2003)



Tableau 1.2 : Les récepteurs de la laminine et leurs ligands

Récepteurs		Ligands
Intégrines	$\alpha 1\beta 1$	Collagène (I, II, IV), laminine (1,2)
	$\alpha 2\beta 1$	Collagène (I, II, IV), laminine, chondroadhérine
	$\alpha 3\beta 1$	Fibronectine, collagène (I), laminine (2, 5, 8, 10, 11), nidogène, épiligrine, perlecan
	$\alpha 6\beta 1$	Laminine (1, 2, 5, 8, 10, 11)
	$\alpha 6\beta 4$	Laminine (1, 2, 5, 10)
	$\alpha 7\beta 1$	Laminine (1, 2, 8, 10)
Récepteur à la laminine de 67kDa		Laminine
CD44		Acide Hyaluronique, collagène (I), laminine, fibrine, fibronectine
Dystroglycane		Laminine (1, 2), agrine, perlecan
Sulphate d'héparane		Laminine (1, 2), collagène XVIII

(Adapté de Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005)



Tableau 1.3 : Les MMPs, leurs substrats et leur expression dans les types cellulaires

MMP	Nom Commun	Substrats	Expression
MMP-1	Collagénase-1	CN types I, II, III, V, VII et X, aggrécane, gélatine, serpine	Fibroblastes, Kératinocytes, Chondrocytes, cellules épithéliales et endothéliales, ostéoblastes, macrophages, et hépatocytes
MMP-2	Gélatinase A	CN types I, IV, V, VII et X, gélatine, élastase, FN, LN, nidogène MMP-9 et MMP-13 actives	Lymphocytes T, fibroblastes, macrophages, et plaquettes
MMP-3	Stromélysine-1	CN types II, IV, IX, X, XI, nidogène, FN, protéoglycane, aggrécane, gélatine, élastine, proMMP-1, proMMP-8 et proMMP-9	Fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales et musculaires lisses vasculaires, ostéoblastes, kératinocytes, macrophages et chondrocytes
MMP-7	Matrilysine	CN type IV, gélatine, élastine, protéoglycane et glycoprotéine	Macrophages, cellules épithéliales et mésangiales
MMP-8	Collagénase-2	CN types I, II, III et V	PMN, chondrocytes, fibroblastes et cellules endothéliales
MMP-9	Gélatinase B	CN type IV, gélatine, aggrécane, LN et nidogène	Lymphocytes T, macrophages, kératinocytes, ostéoblastes, mégacaryocytes, trophoblastes, neutrophiles, éosinophiles et cellules endothéliales
MMP-10	Stromélysine-2	CN type IV, LN, nidogène, FN, protéoglycane et gélatine	Fibroblastes, cellules épithéliales, kératinocytes et lymphocytes T
MMP-11	Stromélysine-3	LN, $\alpha 1$ -inhibiteur des protéinases et $\alpha 1$ -antitrypsine	Cellules mésenchymateuses, cellules épithéliales et fibroblastes
MMP-12	Elastase des macrophages	Elastine	Macrophages
MMP-13	Collagénase-3	CN types I, II, III, IV, V, IX, X et XI, gélatine, LN, ténascine, aggrécane et FN	Fibroblastes et tissus osseux en développement
MMP-14	MT1-MMP	CN types I, II et III, gélatine, FN, LN, VN, aggrécane, nidogène, ténascine, perlecane, protéoglycane, proMMP-2 et proMMP-13	Fibroblastes, cellules épithéliales, macrophages et ostéoblastes
MMP-15	MT2-MMP	CN types I, II et III, gélatine, FN, LN, VN, proMMP-13, proMMP-2, nidogène, ténascine, perlecane, aggrécane	Macrophages et fibroblastes
MMP-16	MT3-MMP	CN types I et III, FN, LN, VN, aggrécane, perlecane, gélatine, caséine, proMMP-2 et proMMP-9	Cerveau, placenta et cellules musculaire lisses vasculaires
MMP-17	MT4-MMP	FN, fibrine et gélatine	Cerveau, tissus reproducteurs et leucocytes
MMP-20	Enamélysine	Amélogénine, aggrécane et la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP)	Cellules odontoblastes
MMP-23			Tissus reproducteurs
MMP-24	MT5-MMP	ProMMP-2 et proMMP-13	Cerveau
MMP-25	MT6-MMP	ProMMP-2	Neutrophiles

(Adapté de Vihinen et Kahari, 2002; Lemaître et D'Armiento, 2006)

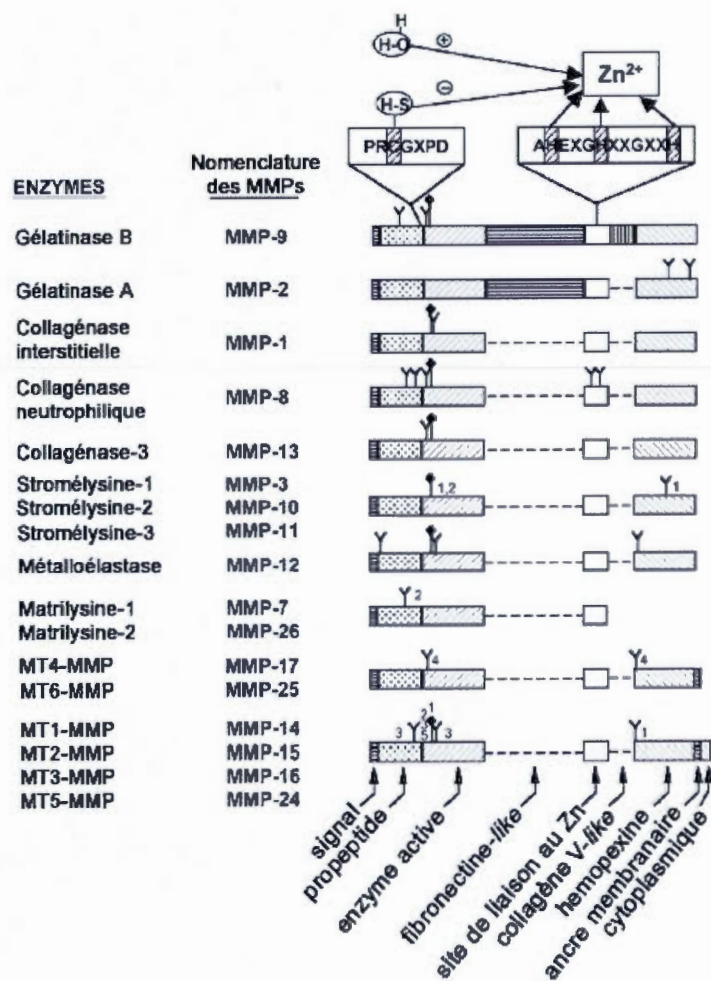


Figure 1.6 : Structures des différents domaines des MMPs. Les sites de N-glycosylation sont symbolisés par un Y (par ¶ pour le site conservé). Les chiffres sur le côté des sites N-glycosylés indiquent les MMPs impliquées. Les séquences consensus sont indiquées au-dessus dans les codes d'acides aminés. (Adaptée de Van den Steen *et al.*, 2002)

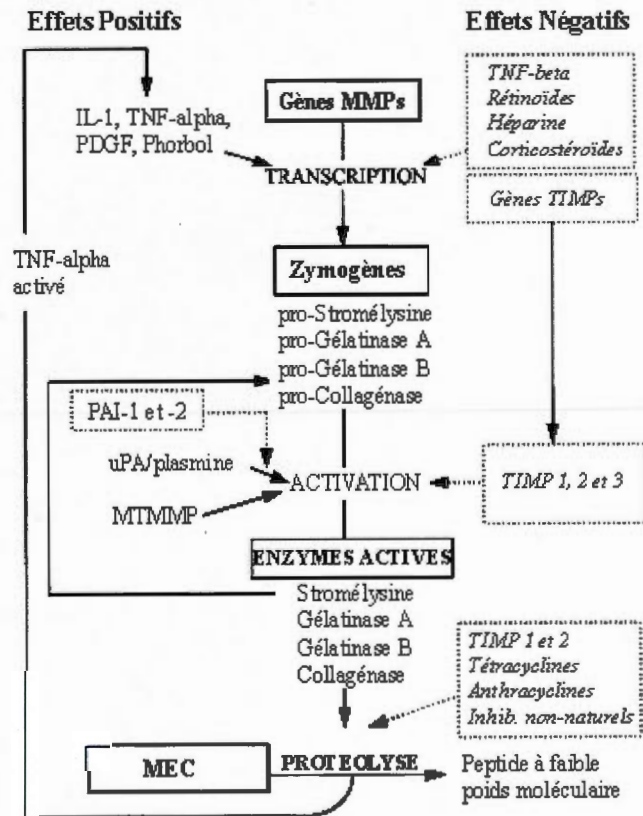


Figure 1.7 : Mécanismes de régulation des MMPs : la transcription, l'activation des proMMP et l'inhibition de l'activité protéolytique des MMPs. (Adaptée de Dollery, McEwan et Henney, 1995)

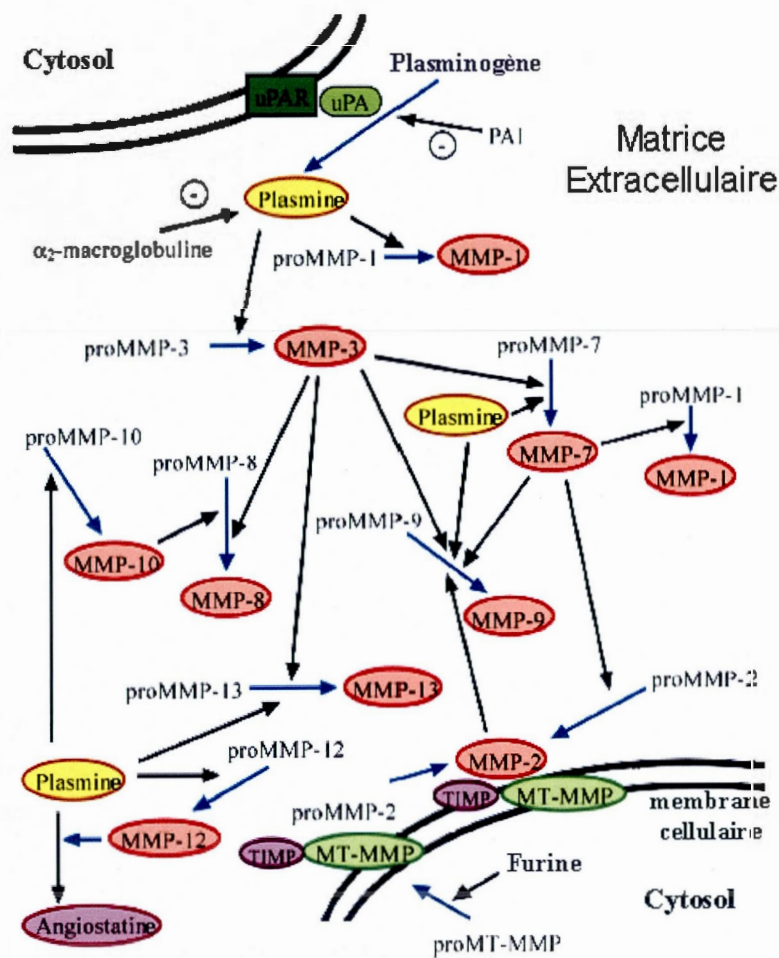


Figure 1.8 : Cascade d'activation des MMPs (Adaptée de Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999)

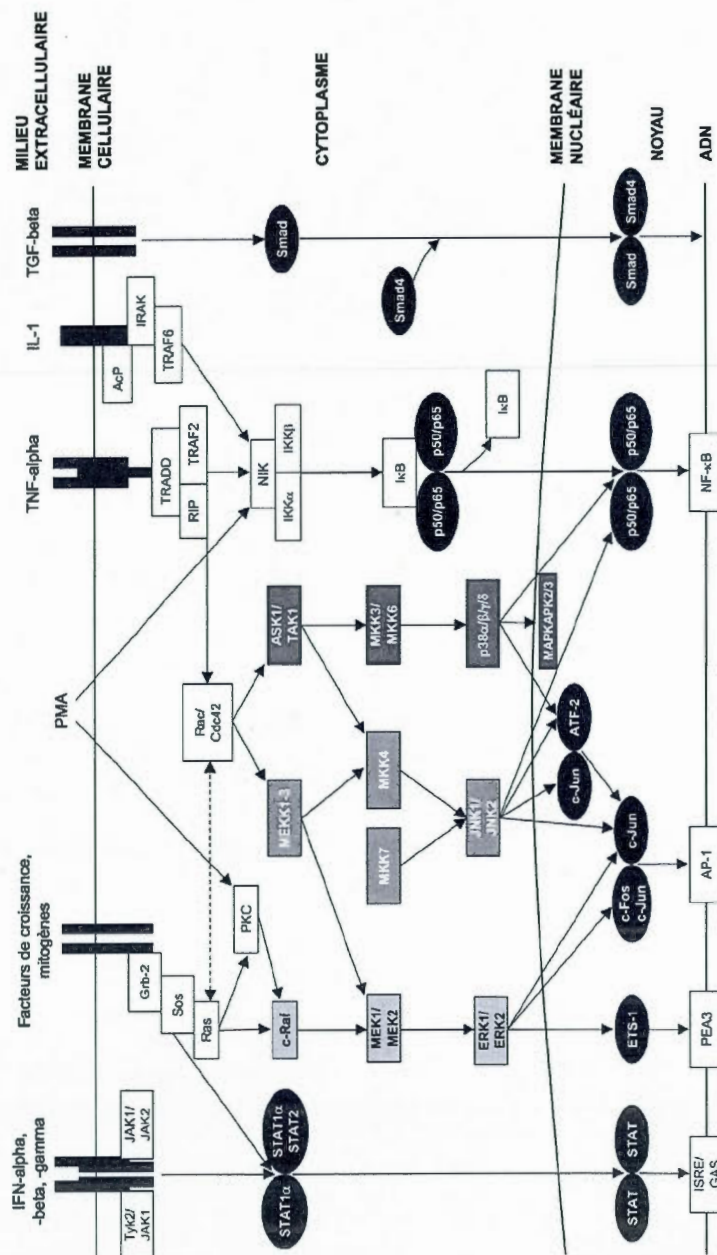


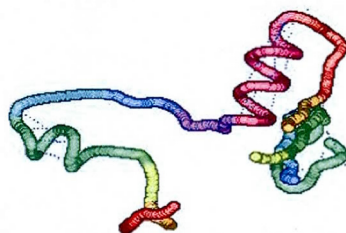
Figure 1.9 : Les voies de signalisation cellulaire qui contribuent à la transcription du gène de MMP-9. Un schéma simplifié des cascades signalétiques qui sont utilisées par les plus importants facteurs de croissance, cytokines et phorbols ester stimulateurs ou inhibiteurs est présenté. Les trois différents modules MAPK sont identifiés par des boîtes grises. Les molécules de signal qui fonctionnent dans le cytoplasme sont illustrées par une boîte blanche, tandis que celles qui transloquent dans le noyau pour former des complexes avec des co-activateurs ou co-supprimeurs, ou qui agissent comme facteurs de transcription directement, sont identifiées par des ellipses noires. (Adaptée de Van den Steen *et al.*, 2002).



Tableau 1.4 : Liste de ARE-BPs (AU-rich elements binding proteins) et de leurs effets sur la stabilité et la traduction de certains ARNm contenant des éléments riches en Adénosine et Uridine

ARE-BPs	Stabilité de l'ARNm		Expression protéique / efficacité de translation		Abondance / Régulation	
	Augmentation	Diminution	Augmentation	Diminution	Augmentation	Diminution
<b>AUF1</b>	c-myc c-fos PTH GM-CSF TNF-alpha	c-myc c-fos p21 cyclin D1 GM-CSF IL-3				GM-CSF IL-3
<b>HuR</b>	c-fos MyoD p21 Cycline A Cycline B1 Cycline D1 NOS/iNOS GM-CSF TNF-alpha Cox-2 IL-3 VEGF Myogénine		p53	TNF-alpha Cox-2	p21 Cycline A Cycline B1 NOS/iNOS GM-CSF Cox-2 IL-3 VEGF p53	TNF-alpha
<b>Hel-N1</b>	TNF-alpha GLUT1		NF-M GLUT1		NF-M GLUT1	
<b>HuD</b>	GAP-43				GAP-43	
<b>TTP</b>		c-fos GM-CSF TNF-alpha Cox-2 IL-2 IL-3				GM-CSF TNF-alpha IL-2 IL-3
<b>BRF1</b>		TNF-alpha IL-3				GM-CSF IL-3
<b>TIA-1</b>				TNF-alpha Cox-2		TNF-alpha Cox-2
<b>KSRP</b>		c-fos NOS/iNOS TNF-alpha IL-2 c-jun				NOS/iNOS
<b>CUG-BP2</b>	Cox-2			Cox-2		Cox-2
<b>Nucléoline</b>	bcl-2					
<b>TINO</b>		bcl-2				
<b>PAIP2</b>	VEGF				VEGF	

(Adapté de Barreau, Paillard et Osborne, 2005)



SCYFIPNEGVPGDSTRKCMDLKGNKHPINSEWQTDNCETCTCYETEISCCTLVSTPVGVD

Figure 1.10: La séquence d'acides aminés du PCK3145. La séquence du peptide synthétique PCK3145 est dérivée de la séquence d'acides aminés 31 à 45 (caractères rouges) de la protéine PSP94.



```

┌ >gi|4499941|emb|CAB39325.1| L beta-microseminoprotein [Homo sapiens]
  Identities = 15/15 (100%), Positives = 15/15 (100%)
  Query: 1 EWQTDNCETCTCYET 15
          EWQTDNCETCTCYET
  Sbjct: 50 EWQTDNCETCTCYET 64

┌ >gi|2506805|sp|P24043|LMA2_HUMAN L Laminin alpha-2 chain precursor
  Identities = 6/6 (100%), Positives = 6/6 (100%)
  Query: 6 NCETCT 11
          NCETCT
  Sbjct: 389 NCETCT 394

┌ >gi|20532393|sp|O15230|LMA5_HUMAN L Laminin alpha-5 chain precursor
  Identities = 5/7 (71%), Positives = 6/7 (85%)
  Query: 6 NCETCTC 12
          NC+ CTC
  Sbjct: 628 NCQACTC 634

┌ >gi|71425|pir||HMFEB1 laminin beta-1 chain precursor - fruit fly
  (Drosophila melanogaster)
  Identities = 9/16 (56%), Positives = 10/16 (62%), Gaps = 5/16 (31%)
  Query: 2 W--QTDN---CETCTC 12
          W Q+DN CE CTC
  Sbjct: 467 WNLQSDNPEGCEPCTC 482

```

Figure 1.11: Les homologues de structure du PCK3145 avec les chaînes précurseurs  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  de la laminine. (Alignement des séquences dans NCBI BLAST)

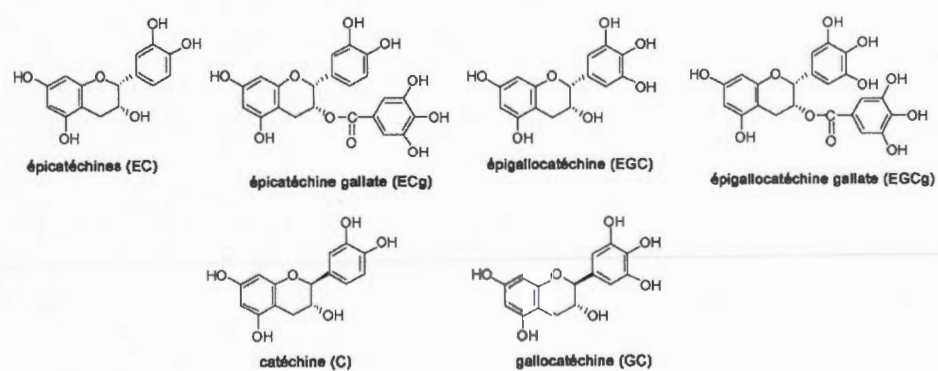


Figure 1.12 : Structure moléculaire des différentes catéchines du thé vert. (Adaptée de Zaveri, 2006)

## CHAPITRE II

### PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU PROJET DE RECHERCHE

#### 2.1 Introduction

Les travaux du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire du Dr. Borhane Annabi sont principalement axés sur la compréhension et la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'invasion et le développement du cancer. Ses recherches se penchent sur les processus associés à la progression tumorale, tels la prolifération et la migration des cellules tumorales, l'angiogénèse et, particulièrement, l'implication des MMPs. De plus, ce laboratoire s'intéresse aux effets anti-cancéreux d'une variété de composés provenant des aliments pouvant être utilisés pour la prévention ou le traitement du cancer. Par exemple, nous avons déjà montré que plusieurs catéchines du thé vert inhibent l'activité protéolytique des MMPs. La compagnie *Procyon Biopharma Inc.* (maintenant *Ambrilia Biopharma Inc.*) est une société biopharmaceutique qui œuvre à la recherche et au développement de traitements innovateurs dans les domaines de l'oncologie et des maladies infectieuses. Le PCK3145, un peptide synthétique dérivé de la protéine native PSP94, est un de leur produit présentement en étude clinique de phase II pour le traitement du cancer de la prostate métastasé avancé. L'action thérapeutique du PCK3145 agit sur la réduction de la croissance des tumeurs prostatiques et les métastases en diminuant le niveau plasmatique de la MMP-9.

Nos travaux ont donc ciblé les mécanismes moléculaires régulant les fonctions de la MMP-9 dans les effets anti-métastatiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert. Ces recherches sont présentées en trois volets dans ce Mémoire. Premièrement, nous nous sommes intéressés aux interactions de surface cellulaire du PCK3145 en se penchant

principalement sur les propriétés de liaison et d'internalisation de ce peptide. Deuxièmement, nous nous attardons aux mécanismes intracellulaires qui découlent de la liaison du PCK3145 à la surface cellulaire. Finalement, le troisième volet tente d'établir les liens entre les mécanismes d'action des catéchines du vert et ceux du PCK3145 dans la modulation de l'expression de MMP-9. L'ensemble des travaux de ce Mémoire cherchaient principalement à éclaircir deux points en particulier quant à la régulation des fonctions de la MMP-9: l'implication de la protéine HuR ainsi que du récepteur à la laminine de 67 kDa.

## **2.2 Contribution du 67LR dans la régulation de MMP-9 par des agents anti-cancéreux: le PCK3145 et les catechines du thé vert**

L'expression élevée de la MMP-9 est fréquemment associée à l'agressivité des cancers puisque cette métalloprotéinase participe à plusieurs étapes de la progression tumorale, incluant l'invasion, l'angiogénèse et la métastase de cellules tumorales. De plus, l'augmentation de l'expression du 67LR a été rapportée dans plusieurs leucémies (Carbone *et al.*, 1995) et dans une variété de carcinomes (côlon, sein, estomac, foie et ovaire) puis corrèle directement avec une prolifération accrue des cellules malignes et la tendance à métastaser (Ménard, Tagliabue et Colnaghi, 1998). L'EGCg, une catéchine majeure du thé, est un ligand du 67LR (Tachibana *et al.*, 2004) et, similairement au PCK3145, inhibe la sécrétion de MMP-9 (Yun *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Nous nous sommes donc demandé si le 67LR était impliqué dans la modulation des effets anti-métastatiques d'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du thé vert.

## **2.3 Implications de HuR dans les effets anti-cancéreux du PCK3145 et des catéchines du thé vert**

Bien que la plupart des études publiées s'attardent sur le contrôle transcriptionnel de la MMP-9, de plus en plus d'information suggère que son expression peut aussi être modulée aux étapes de la stabilité de l'ARNm, la traduction et la sécrétion protéique. L'habileté de moduler l'expression de la MMP-9 à plusieurs étapes par des voies de signalisation distinctes pourrait donc s'avérer particulièrement importante durant la conversion maligne et la métastase lorsque les cellules tumorales doivent induire ou maintenir les niveaux de MMP-9 en réponse à différents changements environnementaux

précis. HuR est une protéine nucléaire qui lie et stabilise l'ARNm de la MMP-9 afin de limiter sa dégradation (Huwiler *et al.*, 2003; Akool *et al.*, 2003). Des études récentes suggèrent que l'expression de la MMP-9 est induite par le facteur nucléaire stabilisateur HuR (Huwiler *et al.*, 2003; Akool *et al.*, 2003). Notre étude a donc investigué la contribution de la protéine HuR dans les processus d'inhibition de l'expression de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du thé vert.

## CHAPITRE III

### MANUSCRITS

**3.1 "Contribution of the 37-kDa laminin receptor precursor in the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 cell surface binding."**

Annabi B., Currie JC., Bouzeghrane M., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R.

*Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 346, 358-366

**3.2 "Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling."**

Annabi B., Bouzeghrane M., Currie JC., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R.

*Anti-Cancer Drugs.* 2006; 17, 429-438

**3.3 "Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg."**

Annabi B., Currie JC., Moghrabi A. & Béliveau R.

*Leukemia Research;* 2007; 31, 1285-1292



**3.1 “Contribution of the 37-kDa laminin receptor precursor in the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 cell surface binding.”**

Annabi B., Currie JC., Bouzeghrane M., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R.

*Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 346, 358-366

La contribution de l’auteur de ce Mémoire pour la réalisation de cet article a été au niveau de la rédaction de l’article et au niveau de l’expérimentation : La totalité des expériences ont été réalisées par cet auteur.

L’auteur du Mémoire est co-premier auteur de cet article

**Contribution du récepteur de la laminine à 37-kDa précurseur dans la liaison de surface cellulaire du peptide anti-métastatique PCK3145 dérivé de PSP-94**

Borhane Annabi<sup>1†</sup>, Jean-Christophe Currie<sup>1†</sup>, Mounia Bouzeghrane<sup>2</sup>, Hélène Dulude<sup>3</sup>, Luc Daigneault<sup>3</sup>, Seema Garde<sup>3</sup>, Shafaat A. Rabbani<sup>4</sup>, Chandra Panchal<sup>3</sup>, Jinzi J. Wu<sup>3</sup> and Richard Béliveau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, <sup>2</sup>Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Québec, Canada, <sup>3</sup>Procyon BioPharma, Inc., Montreal, Québec, Canada, and <sup>4</sup>Department of Medicine, Physiology, and Oncology, McGill University Health Centre, Montreal, Québec, Canada

<sup>†</sup> Ces auteurs ont participé équitablement aux travaux de cet article

**But :** Le PCK3145 est un peptide synthétique anti-métastatique avec une efficacité thérapeutique prometteuse contre le cancer de la prostate réfractaire aux hormones. La caractérisation des mécanismes en surface cellulaire de la liaison/internalisation du peptide PCK3145 et des récepteurs impliqués demeurent à être explorés. **Résultats :** Des essais de liaison en surface cellulaire du [<sup>14</sup>C]PCK3145 ont montré un profil cinétique rapide et transitoire qui était inhibé par des peptides RGD, la laminine, l'acide hyaluronique et le collagène de type-I. Les peptides RGD sont toutefois incapables d'inhiber l'incorporation intracellulaire du PCK3145. Des études de liaison du ligand en Far Western nous ont permis d'identifier le récepteur de la laminine à 37 kDa précurseur (37LRP) comme un ligand potentiel du PCK3145. La surexpression de la protéine recombinante 37LRP a mené à l'augmentation de la liaison du PCK3145 mais de manière surprenante pas à son incorporation. **Conclusions :** Nos résultats supportent que les récepteurs de la laminine sont impliqués dans la liaison de surface cellulaire et dans la transduction des effets anti-métastatiques du PCK3145, et procurent un fondement pour cibler les cancers qui expriment des niveaux élevés de tels récepteurs de la laminine.

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada, <sup>2</sup>Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Quebec, Canada, <sup>3</sup>Procyon BioPharma, Inc., Montreal, Quebec, Canada, and <sup>4</sup>Department of Medicine, Physiology, and Oncology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

**Purpose :** PCK3145 is an anti-metastatic synthetic peptide with promising therapeutic efficacy against hormone-refractory prostate cancer. The characterization of the PCK3145 peptide cell surface binding/internalization mechanisms and of the receptors involved remained to be explored. **Results :** [ $^{14}\text{C}$ ]PCK3145 cell surface binding assays showed rapid and transient kinetic profile, that was inhibited by RGD peptides, laminin, hyaluronan and type-I collagen. RGD peptides were however unable to inhibit PCK3145 intracellular uptake. Far-Western ligand binding studies enabled the identification of the 37-kDa laminin receptor precursor (37LRP) as a potential ligand for PCK3145. Overexpression of the recombinant 37LRP indeed led to an increase in PCK3145 binding but unexpectedly not to its uptake. **Conclusions :** Our data support the implication of laminin receptors in cell surface binding and in transducing PCK3145 anti-metastatic effects, and provide a rational for targeting cancers that express high levels of such laminin receptors.

*Running title: PCK3145 binds to cell surface laminin receptor*

*Key words:* Laminin receptor precursor, prostate cancer, metastasis, MMP-9, EGCg

*The abbreviations used are:* ECM, extracellular matrix; EGCg, epigallocatechin-3-gallate; HRPC, hormone-refractory prostate cancer; 37LRP, 37-kDa laminin receptor precursor; 67LR, 67-kDa laminin receptor; MMP-9, matrix metalloproteinase-9

## INTRODUCTION

Prostate cancer is frequently associated with bone metastases, which are in fact the main cause of morbidity and mortality for this tumor. It is also the most frequently diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer-related deaths in American males [1]. Androgen ablation as initial therapy for advanced prostate cancer provides high response rates but does not cure disease, as nearly all men with metastases will eventually progress to hormone-refractory prostate cancer (HRPC) [2]. Currently no effective treatments exist for patients where hormone treatment has failed, and the management of HRPC is solely palliative. It thus becomes crucial to develop new strategies to circumvent the progression of prostate cancer from localized growth to the invasion of surrounding tissues, and the development of distant bone and visceral organ metastasis. Prostate secretory protein 94 (PSP94), also known as prostatic inhibin or  $\beta$ -microseminoprotein [3], is a naturally occurring protein synthesized primarily in the prostate and found in large quantities in the seminal fluid [4]. Although the complete physiological role of PSP94 is not completely known, it is believed to be involved as a growth inhibitor and a promoter of cell death in the natural control of excessive and/or abnormal proliferation of epithelial cells both in normal prostate tissue as well as in malignant prostate tissues.

Recently, promising roles of PSP94 and, more particularly of one of its derived peptides PCK3145, were highlighted for its potential therapeutic efficacy against prostate cancer and its associated complications in animal models and in human clinical trials [5-7]. Interestingly, the main biological activity of PCK3145 observed in clinical trials was the significant reduction in the level of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in patients with an increased level of this enzyme before treatment [7]. Since a direct role for MMP-9 has been specifically associated with prostate cancer metastasis [8-11], we believe that this marker may accurately be used not only to monitor the efficacy of the treatment using PCK3145 but also to select patients for whom PCK3145 treatment may be beneficial.

Selective interaction of the delivered PCK3145 into the target tissue *in vivo* is expected to enhance drug efficacy. We have recently provided preliminary *in vitro* evidence for the molecular mechanism of action of PCK3145 with implications as an anti-metastatic [12] and anti-angiogenic [13] agent. Moreover, we have also shown that laminin interfered with PCK3145 intracellular signaling [14], and that the expression of HuR, an intracellular RNA-binding protein that can stabilize MMP-9 mRNA, was decreased by PCK3145 [14]. The characterization of the PCK3145 cell surface receptors as well as of the peptide's binding/internalization mechanisms involved remained to be explored as this will further unravel the molecular kinetics regulating both the cell surface and intracellular effects of PCK3145. We thus investigated the specificity and cell surface receptor binding affinity of PCK3145 in light of its bioactivity against MMP-9 secretion. The cell surface binding and internalization processes through specific extracellular matrix (ECM) proteins competition experiments confirmed the implication of laminin receptor activity in PCK3145 cell surface recognition. Our results also highlighted the possibility that alternate cell surface receptors be involved in the internalization mechanisms of PCK3145. Our current observations not only support the implication of laminin receptors in transducing part of the PCK3145 anti-metastatic effects, but also provide a rationale for targeting cancers that express high levels of such laminin receptors.



## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). FUGENE-6 transfection reagent was from Roche Diagnostics Canada (Laval, QC). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The polyclonal antibody against the 67-kDa laminin receptor (67LR) was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), the monoclonal antibody against galectin-3 was from Chemicon (Temecula, CA), and the mouse  $\beta$ -actin monoclonal antibody was from Sigma. The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-N-terminal-labelled PCK3145 was synthesized by EZBiolab (Westfield, IN). Type-I collagen was extracted from rat tail tendon [12]. The GRGDSP peptide was purchased from Bachem (King of Prussia, CA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

**Cell culture and cDNA transfection method :** Previous studies from our laboratory have established the antimetastatic effects of PCK3145 using HT-1080 fibrosarcoma cells *in vitro* model [12, 14]. The HT-1080 cell line was purchased from American Type Culture Collection and maintained in Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The human 37-kDa laminin receptor precursor (37LRP) full-length cDNA was from OriGene Technologies (Rockville, MD). HT-1080 cells were transiently transfected with cDNA using the non-liposomal formulation FUGENE-6 transfection reagent. Transfection efficiency was confirmed by western blotting. All experiments involving these cells were performed 36 hrs following transfection. Mock transfections of HT-1080 cultures with pcDNA (3.1+) expression vector alone were used as controls.

*Immunoblotting procedures:* Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/2,500 dilution for 67LR) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

*PCK3145 cell surface binding and uptake assays :* Characterization studies on PCK3145 properties to bind to the cell surface and to subsequently be internalized were initiated. This is basically achieved by either performing the experiments at 4°C, a condition known to minimize internalization/uptake mechanisms, or at 37°C, a condition that favors both cell surface binding and internalization. The synthesis of [<sup>14</sup>C]-radiolabeled PCK3145 (H-EW-[U-<sup>14</sup>C]Q-TDNC(Acm)ETC(Acm)TC(Acm)YET-OH) was achieved and this allowed us to develop assays with very low background. Assays were performed in 6-well plates with 80% confluent HT-1080 fibrosarcoma cells. Prior to the assay, cells were washed with HBSS buffer and stabilized at either 4°C or 37°C for approximately 15 min. Reactions were initiated by adding 500 µl of Ringer/HEPES containing 0.5% ovalbumin and 0.5-1.0 µCi of [<sup>14</sup>C]PCK3145. Reactions were stopped with rapid aspiration of the media, and cells washed rapidly with 1 ml Ringer/HEPES containing 0.5% ovalbumin. Radioactivity was then counted in the whole cells after the addition of 500 µl NaOH 1N.

*Flow cytometry analysis and fluorescein isothiocyanate-labeled PCK3145 binding assay :* Fluoresceinisothiocyanate (FITC) is currently the most commonly-used fluorescent dye for FACS analysis and was conjugated to the N-terminus of PCK3145. This enables us to follow cell binding of FITC-PCK3145 through the shift in fluorescence associated with cells that bind to it. 80-90% confluent HT-1080 cells were dislodged after brief

trypsinization, washed extensively, resuspended in 10% FBS/DMEM at a concentration of  $10^6$  cells/ml, washed once with 0.1% PBS/ 0.1% BSA and then incubated with 10  $\mu$ g/ml FITC-PCK3145 for 1 hr on ice (4°C). After washing with PBS/BSA, the cells were suspended in 1 ml PBS/BSA, and analyzed on a FACS Calibur flow cytometer with the CellQuestPro software (BD Biosciences, Mississauga, ON). Results are expressed as the ratio of relative geometric mean values from the PCK3145-treated cells to their untreated controls and are representative of three independent experiments

*PCK3145 biotinylation and Far-Western analyses* : PCK3145 was biotin-labeled according to Pierce and purified by FPLC-chromatography using Akta-explorer with a resource RPC-30ml column (Amersham Bioscience, QC). The biotin-labeled peptide was eluted with a gradient from 20% CH<sub>3</sub>CN to 80% CH<sub>3</sub>CN (+0.05%TFA) at a flow rate of 4 ml/min. Products were monitored at different wavelengths (205, 229 and 254 nm) with a UV-900 cell-10. Confluent HT-1080 cell lysates (~50  $\mu$ g/well) were migrated using 10% SDS-gels and then electrotransferred onto PVDF membranes. Membranes were then incubated with 10  $\mu$ g/ml of unlabeled PCK3145 or 10  $\mu$ g/ml biotin-labeled PCK3145 for 1 hr, followed with incubation with HRP-Streptavidin for another hour and ECL detection.

*Statistical data analysis* : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test and was used to compare the PCK3145 effect to vehicle treated cells. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (\*) identifies such significance in each figure.

## RESULTS

*Kinetics of PCK3145 cell surface binding and internalization processes.* Previous evidence using competitive surface binding approaches has led us to conclude that PCK3145 transduced its inhibitory effect through cell surface receptors bearing laminin binding activities [14]. Whether any direct cell surface binding and subsequent internalization processes were involved was next investigated. We performed cell surface binding as well as uptake assays by incubating HT-1080 fibrosarcoma cells with radiolabeled [ $^{14}\text{C}$ ]PCK3145 as described in the methods section. We found that PCK3145 rapidly and transiently bound to the surface of HT-1080 cells peaking within the first 30 seconds, and rapidly returning to basal levels (Fig.1a, left panel). Interestingly, when uptake experiments were performed, PCK3145 internalization also peaked within the first 30 seconds but [ $^{14}\text{C}$ ] radiolabeled cell-associated signal remained sustained for up to 5 minutes (Fig.1a, right panel). These observations are consistent with the "hit-and-run" hypothesis that we have previously suggested in PCK3145 intracellular cell signaling and that rapidly led to extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation [14]. When radiolabeled-PCK3145 binding and uptake experiments were performed with increasing PCK3145 concentrations (Fig.1b), PCK3145 cell surface binding was approximately 2-times lower than uptake. Dissociation constants ( $K_d$ ) were also computed and were not statistically different for both processes ( $9.0 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$  vs  $7.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$  for binding and uptake respectively) and one can conclude that the relative affinity for PCK3145, whether it is in binding or internalization processes, is approximately equivalent.

*Differential inhibitory effect of RGD peptides and type-I collagen on PCK3145 cell surface binding and internalization processes.* We have performed PCK3145 binding and uptake experiments in order to assess whether ECM proteins such as laminin, HA, type-I collagen, or RGD peptides affected cell surface binding processes differently from internalization processes. Results show that besides linear RGD peptides, those three ECM proteins to which PCK3145 inhibited cell adhesion [15] also inhibited PCK3145 internalization process at  $37^\circ\text{C}$  (Fig.2a, black bars). Interestingly, while RGD peptides,

laminin and HA were still able to inhibit PCK3145 cell surface binding at 4°C, type-I collagen was ineffective in doing so (Fig.2a, white bars). An inhibition of PCK3145 cell surface binding was achieved at higher doses of type-I collagen. Relative K<sub>d</sub> constants were computed and show a 17-fold magnitude of change between binding (1.5 µg/ml) and uptake (25.4 µg/ml). Because fibronectin, fibrin, elastin, and vitronectin did not initially interfere with cell-to-PCK3145 interaction [12], they were intentionally not further tested. This set of experiments suggests that potential alternate cell surface receptors from either the integrin or non-integrin family may be involved in transducing PCK3145 intracellular effects. Physiologically, this also implies that PCK3145 may have differential effects that would be dictated by the composition of the ECM tumor microenvironment.

*Identification of the 37-kDa laminin receptor precursor among the potential PCK3145-binding proteins.* In light of the above result, we wished to provide initial clues as for the identity of the potential PCK3145 cell surface binding proteins involved. We thus performed a ligand binding (Far-Western) assay onto PVDF membranes using biotin-labeled PCK3145. Autoradiograms showed some non-specific detection of proteins most probably due to the binding of streptavidin to membranes that were not pre-incubated with biotin-labeled PCK3145 (Fig.3, first lane of left panel). Interestingly, a reproducible staining pattern of approximately 11 candidates was observed in those PVDF membranes that were first incubated with biotin-labeled PCK3145 (Fig.3, second lane of left panel). Because of the potential role that the 67-kDa laminin receptor (67LR) recently played in MMP secretion [15] and in light of our data that laminin competed with PCK3145 effects [14], when those same PVDF membranes were reprobed with a 67LR antibody, candidate number 9 showed immunoreactive property associated with the 67LR precursor at ~35 kDa (Fig.3a, right panel) suggesting that the 37-kDa laminin receptor precursor (37LRP) protein of the mature 67LR protein may be one of the PCK3145 binding proteins. Other non-specific (NS) immunoreactive bands were observed at higher molecular weights, and were also observed in data of Fig.5c. The identity of the remaining PCK3145 binding proteins is under investigation and remains to be elucidated as they can either represent intracellular as well as other cell surface proteins. The potential contribution of cell surface galectin-3, a 31-kDa



laminin binding protein which may cross-react with the 37LRP antibody, was ruled out since when the same PVDF membrane was reprobed, very low to undetectable immunoreactivity was observed in HT-1080 cell lysates in comparison to positive galectin-3 immunoreactivity for the other cell lysates tested (Fig.3b).

*Differential regulation of PCK3145 cell surface binding and internalization by the 37-kDa laminin receptor precursor.* We have further investigated the impact of the 37LRP expression on PCK3145 cell surface binding and internalization processes by transiently transfecting HT-1080 cells with a cDNA plasmid encoding the 37LRP protein (Fig.4a). Interestingly, when PCK3145 cell surface binding was assessed in 37LRP-transfected cells, we noticed a significant ~35% increase when compared to untransfected mock cells (Fig.4b, black bars). This result confirms and supports that obtained in high confluent cells where the increased expression of the 37LRP correlates with an increase in PCK3145 cell surface binding (see next Fig.5). Intriguingly, when these same 37LRP-transfected cells were used to assay PCK3145 internalization, there was no evidence for increase in PCK3145 uptake (Fig.4b). Collectively, these data suggest that the 37LRP is involved in PCK3145 cell surface binding but that alternate cell surface receptors must be engaged in the PCK3145 internalization process.

*Cell confluence regulates the 37-kDa laminin receptor precursor expression and PCK3145 cell surface binding.* In the setting of our experimental conditions to test the different effects of PCK3145, we noticed that the 37LRP was expressed at very low to undetectable levels in low ( $10^4$  cells / well) density, while its expression drastically increased at high ( $10^6$  cells / well) confluent cells cultured for 24 hrs (Fig.5a and Fig.5b). This potential cell-cell contact effect was also observed when cells were harvested at different times of incubation (from 24 to 78 hours) (Fig.5c). This unexpected observation is of crucial importance as it may first explain and optimize the reproducibility of PCK3145 cellular effect, and basically provides an interesting "model" to study the impact of the 37LRP in binding PCK3145 in low 37LRP-expressing cells versus high 37LRP expressing cells.



*The expression of the 37-kDa laminin receptor precursor potentiates EGCg inhibition of cell surface PCK3145 binding.* Although the mature 67LR is thought to be the receptor for the green tea-derived catechin EGCg [16], not much is known about the 37LRP that would enable the generation of a mature 67LR. Interestingly, EGCg is also known for its ability to inhibit MMP-9 secretion [17, 18] an end-point effect that is similar to that of PCK3145 but that does not necessarily involve the same mechanism of action. We sought to investigate the involvement of that potential common 37LRP/67LR in the ability of the cells to bind biotin-labeled PCK3145 by flow cytometry. Low and high confluent cells were harvested and cells incubated with or without biotin-labeled PCK3145 and in the presence or not of 100  $\mu$ M EGCg at 4°C for 1 hr. Cells were then analyzed for the shift in fluorescence following a last incubation with FITC-labeled avidin by flow cytometry (profiles not shown). We show that PCK3145 binds significantly more (~25%) to the cell surface of highly confluent HT-1080 cells (Fig.6a, black bars control). Interestingly, we also show that EGCg only effectively competed with that PCK3145 cell surface binding and completely abolished it in high confluent cells while it only inhibited PCK3145 cell surface binding by approximately 7% in low confluent cells (Fig.6a, black bars EGCg). When the inhibitory effect of PCK3145 on MMP-9 secretion was assessed using these two cell population, we observe that PCK3145 was ineffective in low confluent cells while it significantly inhibited MMP-9 secretion in high confluent cells as assessed by gelatin zymography (Fig.6b) and quantified by scanning densitometry (Fig.6c). This observation correlates and supports the fact that the higher expression of the 37LRP at the cell surface may better transduce the effect of PCK3145. This highlights the potential contribution of 37LRP/67LR as one of the cell surface laminin receptors that may transduce the effects of PCK3145. Collectively, we provide more evidence for the involvement of the 37LRP as one of the PCK3145 cell surface binding protein as EGCg is being able to efficiently compete with PCK3145 for cell surface binding. Since the 37LRP expression is induced in high confluent cells, we may safely infer that the 37LRP may indeed transduce, at least in part, the effects of PCK3145.

## DISCUSSION

Mechanisms by which circulating PCK3145 crosses or interacts with the plasma membrane are still unknown. The kinetics and specificity of interaction of PCK3145 have thus been investigated in order to characterize the potential actors regulating cell surface binding and internalization processes that ultimately lead to decreased expression and secretion of MMP-9. The major observations made in our study highlight the implication of cell surface laminin receptor activity, and more particularly that of the 37LRP. The novel mechanism of PCK3145 laminin receptor-mediated regulation of MMP-9 expression provides foundation of our hypothesis that PCK3145 acts through receptor-mediated signalling and that targeting and inhibiting the 37LRP-mediated signalling may explain the anti-metastatic property of PCK3145. Interestingly, increased expression of the 37LRP/67LR has been reported in a variety of human carcinomas (colon, breast, stomach, liver, and ovary) and directly correlates with a higher proliferation rate of malignant cells and tendency to metastasize [19]. In addition, the 67LR is detectable in anaplastic large cell lymphomas and in small subsets of high-grade B-cell non-Hodgkin's or Hodgkin's lymphomas [20], and found to mediate acute myeloid leukemia cell adhesion to laminin and to be frequently associated with monocytic differentiation [21]. In light of these documented expression of the 67LR, it is thus tempting to suggest that cancers, or specific stage of cancer development such as in monocytic-oriented acute myeloid leukemia, could potentially be efficiently targeted by PCK3145.

In contrast to the 37LRP role that we highlight in PCK3145 cell surface binding, our current observations however preclude any involvement of the 37LRP in PCK3145 uptake processes. Indeed, although a role for the 67LR was recently ascribed in the internalization of proteins or peptides such as CNF-1 [22], the overexpression of the 37LRP recombinant protein did not lead, under our experimental conditions, to increased PCK3145 uptake/internalization whereas cell surface binding was increased in 37LRP-transfected cells. This suggests that either the mature form of the 67LR must be generated or that alternate yet uncharacterized cell surface processes mediate PCK3145 internalization.

Whether this occurs via receptor-mediated endocytosis upon PCK3145 binding to a specific cell surface receptor or by a clatherin- or caveolin-(in)dependent mechanisms remains to be investigated. In fact, our explanation can, at this point, only be speculative, since the relationship between 37LRP and 67LR is unknown so far [23]. One possible explanation would be that the LRP/LR complex would serve in efficient receptor-mediated endocytosis processes such as of the extracellular prion protein [24]. Keeping in mind that laminin plays a central role in cell growth, differentiation and migration and that any interference with these functions, such as by PCK3145, may be deleterious confirms the potential therapeutic actions of PCK3145 in interacting with 37LRP. The presence of a functional 37LRP/67LR complex may thus be required in order to further promote PCK3145 internalization. Several lines of evidence from the current study suggest that PCK3145 physical interaction occurs potentially with proteins isolated from cell lysates and which comprise intracellular as well as plasma membrane bound proteins as demonstrated by the multiple candidates found to interact with PCK3145 in our ligand binding assay. Among the 11 candidates that we have identified, we believe that we have now clearly characterized the implication of the 37LRP. Other proteins of low (less than 30 kDa) or high (more than 75 kDa) molecular weight have also been identified. Their exact identity however remains to be confirmed.

Among the ECM proteins known to potentially bind and interact with laminin receptors, RGD peptides and type-I collagen were found to differentially compete with PCK3145 internalization process and cell surface binding (Fig.2). The fact that RGD peptides inhibited PCK3145 cell surface binding but not internalization processes suggests that those 2 processes occur through different cell surface-mediated mechanisms. These mechanisms may however integrate the cooperative functions of both integrin and non-integrin cell surface receptors which remain to be characterized. In fact,  $\alpha 3 \beta 1$  integrin was recently shown to regulate MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes [25], and provides a similar mechanism of integrin-mediated regulation of MMP gene expression as that involving PCK3145. Recently, emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies aim at targeting the integrin-mediated cell-cell or cell-ECM signaling pathways [26].

MMP-9 is a matrix metalloproteinase involved in prostate cancer progression and which expression can be regulated at several levels [27]. Although most published studies have focused on transcriptional control of MMP-9, there is increasing evidence that its expression can also be regulated at the steps of mRNA stability, translation and protein secretion. The ability to modulate MMP-9 expression at multiple steps through distinct signaling pathways may be particularly important during malignant conversion and metastasis, when tumor cells need to induce or maintain MMP-9 levels in response to changing environmental cues. While PCK3145 did not affect MMP-9 enzymatic activity *per se*, it however significantly reduced HuR, a MMP-9 mRNA stabilizing factor, and its gene expression which, consequently, led to decreased extracellular MMP-9 secreted levels [14]. The fact that the expression of HuR, an intracellular protein, was targeted by PCK3145 keeps open the possibility that, besides intracellular transduction mechanisms regulating HuR expression, some crucial internalization mechanisms may also regulate part of PCK3145 mechanism of action. As HuR also binds to the AU-rich elements of RNAs encoding genes for cytokines, growth factors, tumor suppressor genes, proto-oncogene, and cell cycle regulators, one can envision that downregulation of HuR by PCK3145 may also inhibit cell proliferation or induce apoptosis. These alternate cellular processes are currently under investigation.

In fact, our data suggest that intracellular signalling of PCK3145, that leads to the inhibition of MMP-9 extracellular levels, is mediated by the laminin receptor-like activity such as that transduced by the 37LRP. This highlights the potential contribution of 37LRP as one of the cell surface laminin receptors that may transduce the effects of PCK3145. Noteworthy, an alternative interpretation of these results may also rely on the fact that the increase in 37LRP protein expression in high confluent cells represents approximately 5-6 times that expression in low confluent cells. In contrast, an increase of only 25% is observed in PCK3145 cell surface binding. This suggests that a potential cell surface 37LRP sub-population may not be as effective in binding PCK3145 or that these may not be in the right conformation. This is further re-enforced by the unexpected observation that PCK3145

shares, to some extent, homology with different structural chains of laminin (not shown) and suggests that it may indeed also share the potential to interact with the same cell surface receptors. Moreover, EGCg, a green tea catechin that similarly to PCK3145 inhibits MMP-9 secretion, is also a 67LR ligand [16] and antagonized cell binding to PCK3145. This confirms that such cell surface receptors regulate PCK3145 effects. Collectively, our data support the implication of cell surface laminin receptors in binding and transducing PCK3145 effects that lead to MMP-9 diminished secretion and provide a rationale for targeting cancers that express high levels of such laminin receptors.

*Acknowledgments:* B.A. holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Drs Michel Demeule and Christian Ché for the purification of biotin-labelled PCK3145 by FPLC.

## REFERENCES

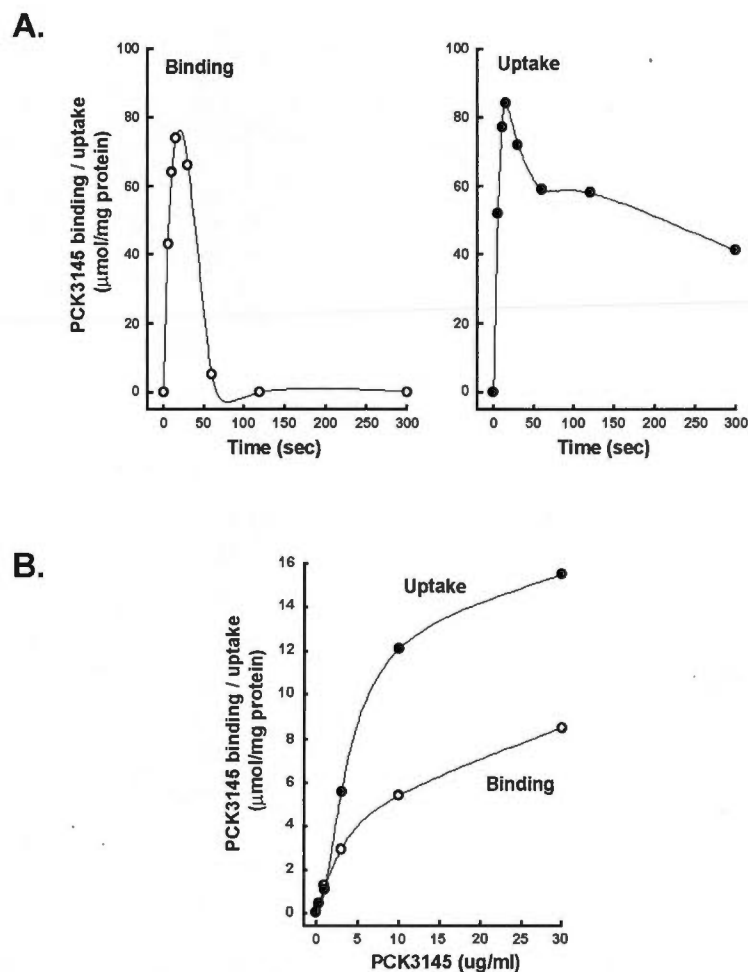
- [1] Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 1588-1592.
- [2] Goodin S, Rao KV, DiPaola RS. State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Oncologist*. 7 (2002) 360-370.
- [3] Yang JP, Finkelman MA, Clarke MW. Detection of PSP94 and its specific binding sites in the prostate adenocarcinoma cell line LNCaP. *J Urol* 160 (1998) 2240-2244.
- [4] Sakai H, Tsurusaki T, Kanda S, et al. Prognostic significance of  $\beta$ -microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer. *Prostate* 38 (1999) 278-284.
- [5] Shukeir N, Arakelian A, Kadhim S, et al. Prostate secretory protein PSP94 decreases tumor growth and hypercalcemia of malignancy in a syngenic *in vivo* model of prostate cancer. *Cancer Res* 63 (2003) 2072-2078.
- [6] Shukeir N, Arakelian A, Chen G, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res* 64 (2004) 5370-5377.
- [7] Hawkins RE, Daigneault L, Cowan R, Griffiths R, Panchal C, Armstrong A, et al. Safety and tolerability of PCK3145, a synthetic peptide derived from prostate secretory protein 94 (PSP94) in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 4 (2005) 91-99.
- [8] Gohji K, Fujimoto N, Hara I, Fujii A, Gotoh A, Okada H, et al. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer*. 79 (1998) 96-101.
- [9] Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res*. 58 (1998) 1395-1399.
- [10] Lokeshwar BL. MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 878 (1999) 271-289.
- [11] Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarritz B, et al. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 94 (2002) 17-25.



- [12] Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Ruiz MT, Wisniewski J, Garde S, et al. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding : Implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 22 (2005) 429-439.
- [13] Lamy S, Ruiz MT, Wisniewski J, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, et al. A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 antagonizes VEGF signaling in endothelial cells: Implication in tumor angiogenesis. *International J Cancer* 118 (2006) 2350-2358.
- [14] Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Dulude H, Daigneault L, Garde S, et al. The inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptors signalling. *Anticancer Drugs* 17 (2006) 429-438.
- [15] Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor. *Cancer Res.* 64 (2004) 3572-3579.
- [16] Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* 11 (2004) 380-381.
- [17] Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res.* 39 (2004) 300-307.
- [18] Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Shin BA, et al. EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Res.* 24 (2004) 747-753.
- [19] Menard S, Tagliabue E, Colnaghi MI. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 52 (1998) 137-145.
- [20] Carbone A, Gloghini A, Colombatti A, Castronovo V, Menard S. Expression of the monomeric 67-kd laminin-binding protein in human lymphomas as defined by MLuC5 monoclonal antibody and paraffin section immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 26 (1995) 541-546.
- [21] Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, Rotoli B, Rossi G. Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res.* 5 (1999) 1465-1472.

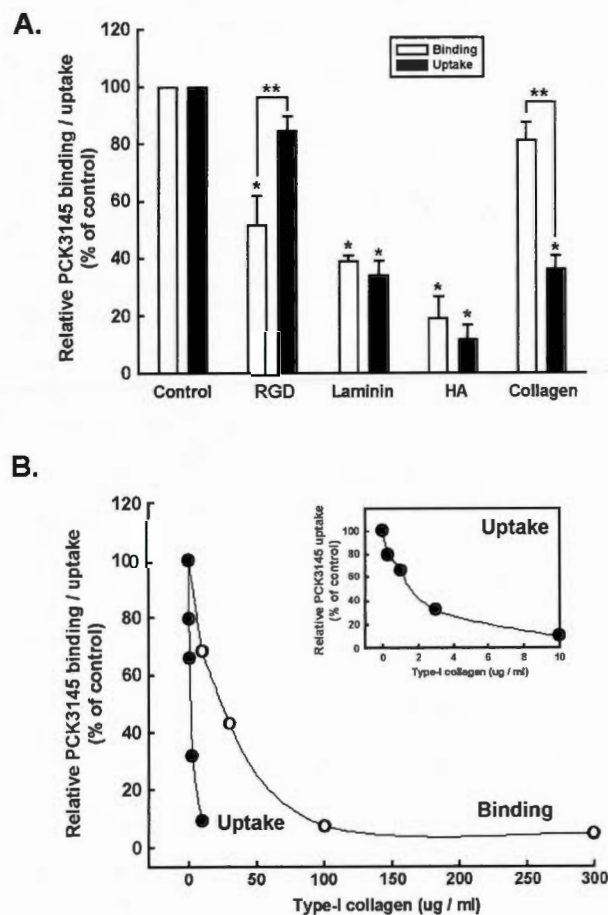
- [22] Kim KJ, Chung JW, Kim KS. 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 280 (2005) 1360-1368.
- [23] Gauczynski S, Hundt C, Leucht C, Weiss S. Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv Protein Chem*. 57 (2001) 229-272.
- [24] Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J*. 20 (2001) 5863-5875.
- [25] Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM. Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci*. 118 (2005) 1185-1195.
- [26] St-Pierre Y, Van Themsche C, Esteve PO. Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2 (2003) 206-215.
- [27] Nair RR, Boyd DD. Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression. *Biochem Soc Trans*. 33 (2005) 1135-1136.

Fig.1



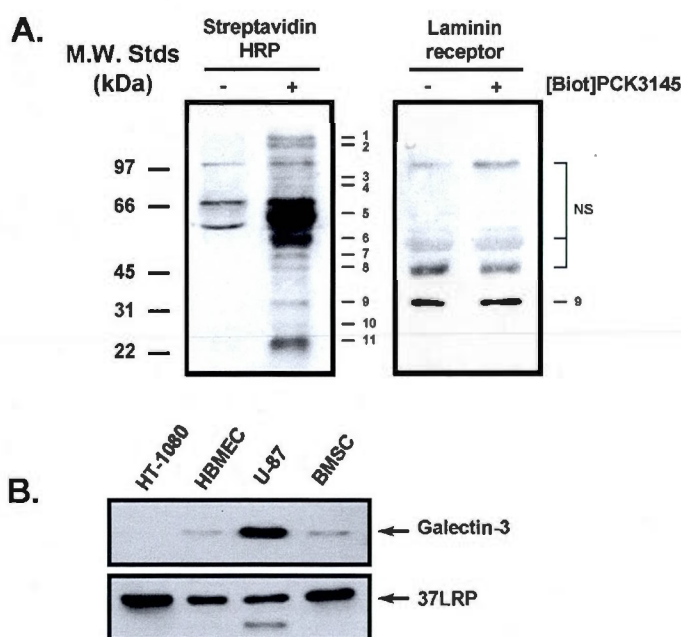
**Fig.1: Differential kinetics in PCK3145 cell surface binding and internalization processes.** (A) HT-1080 fibrosarcoma cells were treated with 30  $\mu\text{g/ml}$  [ $^{14}\text{C}$ ]labelled-PCK3145 at 4°C (binding assay) or 37°C (uptake assay) as described in the Methods section. PCK3145 binding/uptake assays were performed for up to 5 minutes. Data are from one representative experiment. (B) Increasing concentrations of PCK3145 were used to monitor cell surface binding and uptake. Kinetic constants were derived from these data.

Fig.2

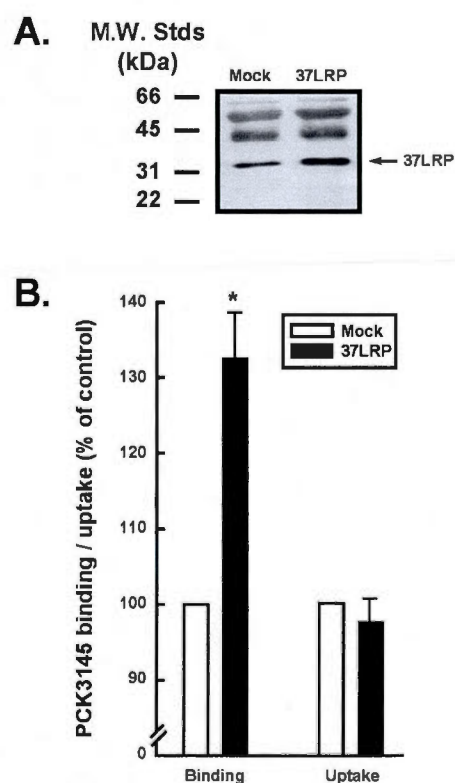


**Fig.2: Differential inhibitory effect of type-I collagen on PCK3145 cell surface binding and internalization processes.** (A) Cells were incubated for 15 seconds with 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PCK3145 in combination or not of 1  $\mu\text{M}$  RGD peptide or 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of laminin, hyaluronic acid (HA), or type-I collagen. Cell surface binding (white bars) or uptake (black bars) were monitored as described in the Methods section. Data are expressed as the % of untreated controls, and are the mean of three independent experiments. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (\*\*) identifies such significance cell surface binding and uptake experiments. (B) Relative PCK3145 binding or uptake were monitored in cells that were incubated for 15 sec with 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PCK3145 in the presence or not of type-I collagen. Insert represents the representative dose response as monitored for PCK3145 uptake in the presence of low type-I collagen concentrations.

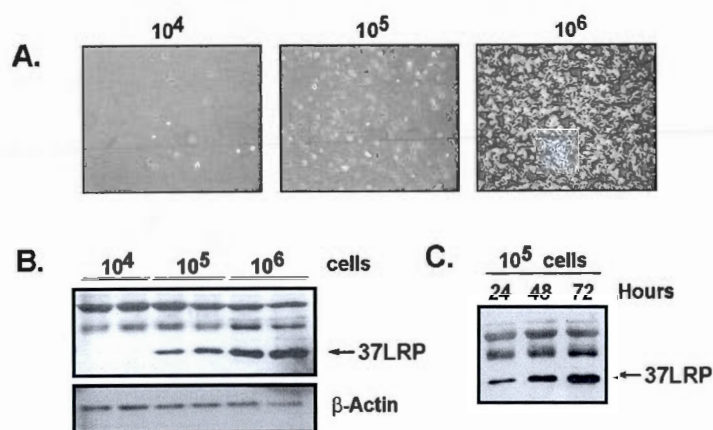
Fig.3



**Fig.3 : Identification of the 37-kDa laminin receptor precursor among the potential PCK3145-binding proteins.** PCK3145 was biotin-labelled and purified as described in the Methods section. (A) One hundred  $\mu$ g of proteins were loaded in each well of a 10% SDS-PAGE from lysates isolated from confluent HT-1080 cells. Migration was followed by PVDF membranes electroblotting and incubation with HRP-Streptavidin or biotin-labelled PCK3145 as described in the Methods section. The left panel was incubated (+) or not (-) with biotin-labelled PCK3145 and bands revealed using Streptavidin-HRP coupled to ECL detection. Right panel represents the same PVDF membrane blotted with an anti-67 kDa laminin receptor (67LR) antibody. Numbers (1 to 11) next to the left panel represent the potential proteins that interact with PCK3145. Band number 6 represents the 37LRP immunoreactive band that is similar to that same band identified in the left panel. NS : non specific immunoreactive band. (B) Lysates (30  $\mu$ g/well) from HT-1080 cells, U-87 glioma cells, human brain endothelial microvascular cells (HBMEC), and bone marrow stromal cells (BMSC) were electrophoresed, transferred to PVDF membranes and immunodetection performed to assess the expression of the 37LRP and of the galectin-3 proteins.

**Fig.4**

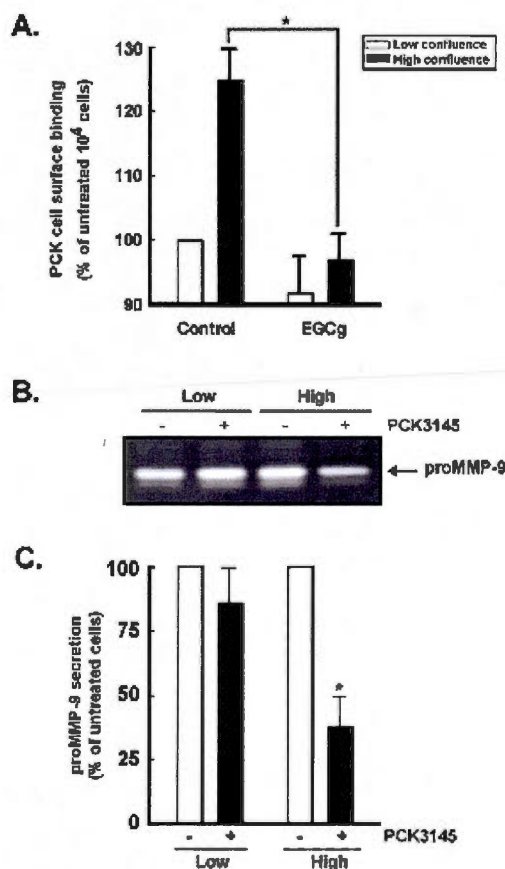
**Fig.4 : The expression of the 37-kDa laminin receptor precursor regulates PCK3145 cell surface binding but not internalization.** (A) HT-1080 cells were transiently transfected with a cDNA encoding the 37LRP. Cell lysates were isolated and immunoblot performed as described in the methods section. (B) Mock (white bars) and 37LRP (black bars) HT-1080 cells were trypsinized and PCK3145 cell surface binding and uptake monitored as described in the legend of Fig.2B.

**Fig.5**

**Fig.5 : Cell confluence regulates the 37-kDa laminin receptor precursor expression and PCK3145 cell surface binding.** (A) HT-1080 cells were seeded in individual wells of a 6-well plate at increasing confluence ( $10^4$  to  $10^6$  cells/well) and pictures taken 24 hrs later. (B) Cell lysates were isolated in duplicate from each cell confluence culture condition. SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-67LR was performed at 24 hrs. (C) HT-1080 cells were seeded at  $10^5$  cells/well in a 6-well culture plate and lysates were isolated at 24, 48, and 72 hrs.



Fig.6



**Fig.6 : The expression of the 37-kDa laminin receptor protein potentiates EGCg inhibition of cell surface PCK3145 binding.** (A) Low confluent HT-1080 cells ( $10^4$  cells/well, white bars) were trypsinized and incubated with biotin-labelled PCK3145 at  $4^\circ\text{C}$  as described in the Methods section. PCK3145 cell surface binding was monitored by flow cytometry in cells that were incubated or not with  $100\ \mu\text{M}$  EGCg and binding compared to that of high confluent cells ( $10^6$  cells/well, black bars). Statistical significance (\*) for the effect of EGCg on PCK3145 cell surface binding between high and low confluent cells is indicated. (B) proMMP-9 secretion from low and high confluent cells was monitored by gelatin zymography in serum-starved cells that were incubated or not with  $300\ \mu\text{g/ml}$  PCK3145 for 48 hrs. (C) The extent of proMMP-9 gelatinolytic activity was quantified by scanning densitometry from three different zymograms and expressed as the percent of untreated cells in low and high confluent cells. Statistical significance is denoted by the asterisk (\*).

3.2 *"Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling."*

Annabi B., Bouzeghrane M., Currie JC., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani SA., Panchal C., Wu JJ. & Béliveau R.

*Anti-Cancer Drugs.* 2006; 17, 429-438

La contribution de l'auteur de ce Mémoire pour la réalisation de cet article a été au niveau de la participation à la rédaction de l'article et au niveau de l'expérimentation : la moitié des expériences a été réalisées par cet auteur.

L'auteur du Mémoire est troisième auteur de cet article

**L'inhibition de la sécrétion de MMP-9 par le peptide anti-métastatique PCK3145 dérivé de la PSP94 requière la signalisation intracellulaire des récepteurs de la laminine en surface cellulaire**

Borhane Annabi<sup>a</sup>, Mounia Bouzeghrane<sup>b</sup>, **Jean-Christophe Currie<sup>a</sup>**, Hélène Dulude<sup>c</sup>, Luc Daigneault<sup>c</sup>, Seema Garde<sup>c</sup>, Shafaat A. Rabbani<sup>d</sup>, Chandra Panchal<sup>c</sup>, Jinzi J. Wu<sup>c</sup> and Richard Béliveau<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>b</sup>Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Montreal, Quebec, Canada, <sup>c</sup>Procyon BioPharma, Inc., Montreal, Quebec, Canada, and <sup>d</sup>Department of Medicine, Physiology, and Oncology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

**But:** Le PCK3145 est un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 31-45 de la protéine native PSP-94 qui peut réduire les métastases skeletiques expérimentales et la croissance des tumeurs de la prostate. Ces effets anti-métastatiques et anti-tumoraux du PCK3145 sont partiellement expliqués par la diminution des niveaux extracellulaires de la métalloprotéinase de la matrice (MMP)-9 dans les modèle *in vivo* et *in vitro*. Toutefois, les mécanismes d'action moléculaires ne sont pas encore identifiés. **Méthodologie :** La zymographie sur gélatine et l'immunobuvardage ont été utilisés pour analyser les niveaux de MMP-9 sécrétés suite à différents traitements sur les cellules HT-1080. La cytométrie de flux a été utilisée pour évaluer la liaison du PCK-FITC et de la laminine-biotinylée à la surface des cellules HT-1080. Un pétri de culture cellulaire recouvert du PCK3145 a été utilisé pour analyser l'adhésion cellulaire. Des lysats cellulaires de HT-1080 ont été utilisés pour analyser l'expression protéique de HuR, ERK et de phospho-ERK en immunobuvardage. L'ARN total a été isolé pour évaluer l'expression génique de HuR par RT-PCR. **Résultats :** Nous montrons que le PCK3145 lie la surface cellulaire des HT-1080, et que cette liaison enclenche la phosphorylation rapide de ERK qui, ultimement, mène à la réduction de la MMP-9 sécrétée. La laminine inhibe la liaison en surface cellulaire ainsi que la phosphorylation de ERK induite par le PCK3145. La surexpression du récepteur de la laminine à 67-kDa mène à une augmentation de la liaison cellulaire du PCK3145. HuR, une protéine qui peut lier et stabiliser l'ARNm de MMP-9, est modulée à la baisse par le PCK3145. L'inhibiteur de MEK, PD98059, en plus de la laminine native et du SIKVAV, un peptide dérivé de la laminine, prévient cette régulation à la baisse. **Conclusions :** Nos résultats suggèrent que le PCK3145 déclenche une signalisation intracellulaire rapide à travers les récepteurs de la laminine en surface cellulaire. Ceci mène à une diminution de l'expression de HuR et à une déstabilisation subséquente des transcripts de la MMP-9. Ceci représente le premier indice moléculaire qui démontre la signalisation intracellulaire et le mécanisme d'action anti-métastatique du PCK3145 qui mène à l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9.

**The inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptors signaling**

Borhane Annabi<sup>1a</sup>, Mounia Bouzeghrane<sup>1b</sup>, **Jean-Christophe Currie<sup>a</sup>**, Hélène Dulude<sup>c</sup>, Luc Daigneault<sup>c</sup>, Seema Garde<sup>c</sup>, Shafaat A. Rabbani<sup>d</sup>, Chandra Panchal<sup>c</sup>, Jinzi J. Wu<sup>c</sup> and Richard Béliveau<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>b</sup>Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Montreal, Quebec, Canada, <sup>c</sup>Procyon BioPharma, Inc., Montreal, Quebec, Canada, and <sup>d</sup>Department of Medicine, Physiology, and Oncology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

**Purpose :** PCK3145 is a synthetic peptide corresponding to amino acids 31-45 of prostate secretory protein 94 which can reduce experimental skeletal metastases, and prostate tumor growth. These antimetastatic and antitumoral effects of PCK3145 are partially explained by the *in vivo* and *in vitro* decrease in matrix metalloproteinase (MMP)-9 extracellular levels through, however, yet unidentified molecular mechanisms of action. **Experimental design :** Gelatin zymography and immunoblots were used to monitor the levels of secreted MMP-9 from HT-1080 cells. Flow cytometry was used to monitor HT-1080 cell surface binding of FITC-labeled PCK3145 and of biotin-labeled laminin. PCK3145-coated cell culture dishes were used to monitor cell adhesion. HT-1080 cell lysates were used for immunoblotting of HuR, ERK and phosphoERK. Total RNA was isolated and RT-PCR used to monitor HuR gene expression. **Results :** We found that PCK3145 bound to HT-1080 cell surface, and that this binding rapidly triggered ERK phosphorylation that, ultimately, led to a reduction of secreted MMP-9. Laminin inhibited both cell surface binding and ERK phosphorylation by PCK3145. Overexpression of the 67-kDa laminin receptor led to an increased binding of the cells to PCK3145. HuR, a protein that can bind to and stabilize MMP-9 mRNA, was found downregulated by PCK3145. The MEK inhibitor PD98059 as well as native laminin and SIKVAV laminin-derived peptide prevented that downregulation. **Conclusions :** Our data suggest that PCK3145 rapidly triggers intracellular signaling through cell surface laminin receptors. This leads to decreased HuR expression and subsequent destabilization of MMP-9 transcripts. This is the first molecular evidence demonstrating the intracellular signaling and antimetastatic mechanism of action of PCK3145 that leads to the inhibition of MMP-9 secretion.

*Running title : PCK3145 binds to cell surface laminin receptors*

*Key words : ERK, laminin receptor, prostate cancer, metastasis, HuR, MMP-9*

*The abbreviations used are : ECM, extracellular matrix; EGCg, epigallocatechin-3-gallate; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; HRPc, hormone-refractory prostate cancer; 67LR, 67-kDa laminin receptor; MMP-9, matrix metalloproteinase-9*

## INTRODUCTION

Prostate cancer is frequently associated with bone metastases, which are in fact the main cause of morbidity and mortality for this tumor. It is also the most frequently diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer-related deaths in American males [1]. Androgen ablation as initial therapy for advanced prostate cancer provides high response rates but does not cure disease, as nearly all men with metastases will eventually progress to hormone-refractory prostate cancer (HRPC). Currently no effective treatments exist for patients where hormone treatment has failed, and the management of HRPC is solely palliative. It thus becomes crucial to develop new strategies to circumvent the progression of prostate cancer from localized growth to the invasion of surrounding tissues, and the development of distant bone and visceral organ metastasis. Prostate secretory protein 94 (PSP94), also known as prostatic inhibin or  $\beta$ -microseminoprotein [2], is a naturally occurring protein synthesized primarily in the prostate and found in large quantities in the seminal fluid [3]. Although the complete physiological role of PSP94 is not completely known, it is believed to be involved as a growth inhibitor and a promoter of cell death in the natural control of excessive and/or abnormal proliferation of epithelial cells both in normal prostate tissue as well as in malignant prostate tissues.

In previous studies, we have shown that PSP94 can reduce experimental skeletal metastases and prostate cancer growth *in vivo* [4], and that the amino acid 31–45 region of PSP94 (PCK3145) was sufficient to elicit PSP94-mediated anti-tumor effects [5]. More recently, a concluded phase IIa clinical trial indicated that PCK3145 down-regulated the levels of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-9 in patients with HRPC that had elevated levels ( $>100 \mu\text{g/L}$ ) at baseline [6]. Such therapeutic efficacy in reducing the levels of plasma MMP-9 in HRPC patients receiving PCK3145 suggests a biological effect possibly targeting the control of tumor-related ECM degradation and metastasis without safety concerns nor adverse effects.

We have recently reported several molecular processes involved in tumor progression and which are targeted by PCK3145. Indeed, we demonstrated the potential antiangiogenic effect of PCK3145 *in vivo* and *in vitro* in endothelial cells as it inhibited VEGF signaling through the tyrosine kinase activity associated with the VEGF receptor [7]. Moreover, we also have provided evidence for an antimetastatic effect of PCK3145 targeting both MMP-9 secretion and subsequent cell surface docking to CD44 [8]. However, the complete mechanism of action of PCK3145, including the elucidation of the cell surface receptors and intracellular pathways that lead to reduced MMP-9, remained elusive. Our study shows for the first time that cell surface laminin receptors transduce PCK3145 intracellular signaling which involves a rapid and transient phosphorylation of ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase). These effects of PCK3145 lead to the inhibition of the MMP-9 mRNA-binding and stabilizing protein HuR gene and protein expressions. The identification of the mechanism of action of PCK3145 as well as the potential involvement of cell surface laminin receptors allows to extend PCK3145 ability to target other types of cancer such as those expressing high levels of laminin receptors as observed in leukemia cells within bone marrow.



## MATERIALS AND METHODS

*Materials.* Agarose, sodium dodecylsulfate (SDS), gelatin, bovine serum albumin (BSA), and Triton X-100 were purchased from Sigma (Oakville, ON). TriZOL reagent was from Life Technologies (Gaithersburg, MD). FUGENE-6 transfection reagent was from Roche Diagnostics Canada (Laval, QC). Type-I collagen was extracted from rat tail tendon according to classical protocols [9]. Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The polyclonal antibodies against 67-kDa laminin receptor (67LR) and HuR were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The anti-phospho-ERK was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) while the polyclonal anti-MMP-9 and ERK antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-N-terminal-labelled PCK3145 the laminin-1-derived peptide SIKVAV were synthesized by EZBiolab (Westfield, IN). Epigallocatechin-3-gallate (EGCg) and all other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

*Cell culture and cDNA transfection method :* The HT-1080 cell line was purchased from American Type Culture Collection and maintained in Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The human 67LR full-length cDNA was from OriGene Technologies (Rockville, MD). HT-1080 cells were transiently transfected with cDNA using the non-liposomal formulation FUGENE-6 transfection reagent. Transfection efficiency was confirmed by western blotting. All experiments involving these cells were performed 36 hrs following transfection. Mock transfections of HT-1080 cultures with pcDNA(3.1<sup>+</sup>) expression vector alone were used as controls.

*Total RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis :* Total RNA was extracted from monolayers of cultured HT-1080 cells using the TriZOL reagent. One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Burlington, ON). Primers for HuR (forward : 5'-TCGCAGCTGTACCACTCGCCAG-3', reverse : 5'-CCAAACATCTGCCAGAGGATC-3') [10] were derived from human sequences and PCR conditions were optimized so that the gene products were at the exponential phase of the amplification. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels containing 1 µg/ml ethidium bromide.

*Immunoblotting procedures:* Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked overnight at 4°C with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000 dilution for MMP-9, HuR, ERK, and phospho-ERK detection) or anti-mouse IgG (1/5,000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

*Gelatin zymography :* To assess the extent of MMP-9 activity, gelatin zymography was used as described previously [11]. Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background. All experiments were carried out with cells that had been serum-deprived by overnight incubation.

*Cell adhesion assays* : Adhesion assays were performed as previously described [12]. Briefly, adhesion wells were coated with increasing concentrations of PCK3145 for 2 hrs at 37°C, and then blocked by adding a solution of PBS/BSA 0.5%. Cells were harvested as a single cell suspension by treatment with 0.53 mM EDTA in PBS pH 7.2, added to pre-coated wells and allowed to adhere to the substrata for 4 hrs at 37°C. After washing, adherent cells were stained with a solution of 0.1% crystal violet/20% (v/v) methanol and lysed with 1% SDS. Spectrophotometric absorbance was then measured at 600 nm.

*Flow cytometry analysis and fluorescein isothiocyanate-labeled PCK3145 binding assay* : Fluorescein isothiocyanate (FITC) is currently the most commonly-used fluorescent dye for FACS analysis and was conjugated to the N-terminus of PCK3145. This enables us to follow cell binding of FITC-PCK3145 through the shift in fluorescence associated with cells that bind to it. 80-90% confluent HT-1080 cells were dislodged after brief PBS-citrate treatment, washed extensively, resuspended in 10% FBS/DMEM at a concentration of  $10^6$  cells/ml, washed once with 0.1% PBS/ 0.1% BSA and then incubated with 10 µg/ml FITC-PCK3145 for 1 hr on ice (4°C). After washing with PBS/BSA, the cells were suspended in 1 ml PBS/BSA, and analyzed on a FACS Calibur flow cytometer with the CellQuestPro software (BD Biosciences, Mississauga, ON). Results are expressed as the ratio of relative geometric mean values from the PCK3145-treated cells to their untreated controls and are representative of three independent experiments.

*PCK3145 biotinylation and HPLC analyses* : PCK3145 was biotin labeled according to Pierce and purified by FPLC-chromatography using Akta-explorer with a resource RPC-30ml column (Amersham Bioscience QC). The biotin-labeled peptide was eluted with a gradient from 20% CH<sub>3</sub>CN to 80% CH<sub>3</sub>CN (+0.05%TFA) at a flow rate of 4 ml/min. Products were monitored at different wavelengths (205, 229 and 254 nm) with a UV-900 cell-10.

*Gene reporter assay* : The Great EscAPe SEAP reporter system (CLONTECH), in which a secretory alkaline phosphatase (SEAP) form is fused to promoters activated by different responsive elements (described in the legend of Fig.5), was used to monitor the effect of PCK3145 on different response elements. Cells were transfected with the various constructs and aliquots of the conditioned media were collected at different times. SEAP activity was measured by the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate [13].

*Statistical data analysis* : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test and was used to compare the PCK3145 effect to vehicle treated cells. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (\*) identifies such significance in each figure.

## RESULTS

*PCK3145 inhibits MMP-9 secretion from HT-1080 cells.* PCK3145 was shown to reduce the levels of circulating MMP-9 plasma levels in phase IIa clinical trial [6]. In order to investigate and confirm the effect of PCK3145 on MMP-9 secretion *in vitro*, we treated serum-starved HT-1080 fibrosarcoma cells with increasing doses of PCK3145 for 48 hrs [8]. Doses of PCK3145 were found not to be cytotoxic as assessed by the measurement of the pro-apoptotic caspase-3 activity (not shown). MMP-9 extracellular levels were then assessed by western blotting and immunodetection. As expected from the clinical data, MMP-9 extracellular levels decreased significantly in a dose-dependent manner in PCK3145-treated cells (Fig.1a). A maximum inhibition of approximately 80% of extracellular levels of MMP-9 was observed at 300  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.1b). This *in vitro* result confirms those observed in the phase IIa clinical trial on the efficacy of PCK3145 to decrease MMP-9 levels.

*PCK3145 binding to the cell surface of HT-1080 cells is inhibited by laminin.* In order to assess whether the inhibitory action of PCK3145 on MMP-9 secretion involves any cell surface receptors-mediated signaling, we first need to know if PCK3145 binds to the cell surface of HT-1080 fibrosarcoma cells. N-terminal fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled PCK3145 was synthesized and incubated with HT-1080 cells for 30 minutes at 4°C in order to minimize intracellular uptake of the labelled-peptide [14], and cell-associated fluorescence measured by flow cytometry as described previously [15]. As shown by the significant shift in fluorescence, we demonstrate that FITC-PCK3145 effectively bound to the HT-1080 cell surface in a dose-dependent manner with a plateau reached around 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.2a). Furthermore, because we had previously shown that PCK3145 inhibited cell adhesion to laminin [8] and that this may inhibit metastasis processes, we also performed a competition experiment by incubating the cells with FITC-labelled PCK3145 (Fig.2B, upper panel, shaded plot) or with both laminin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) and FITC-labelled PCK3145 (Fig.2B, lower panel). Interestingly, our results show a complete inhibition of PCK3145 cell surface binding in the presence of excess laminin (Fig.2b). This latter observation is the first

evidence that cell surface receptors with laminin-binding activities might trigger the subsequent intracellular signaling by PCK3145.

*PCK3145 inhibits cell surface binding of laminin.* In an attempt to characterize the potential laminin receptor involved in PCK3145 binding to the cells, we decided to label laminin with biotin and to analyze cell surface binding by flow cytometry. Moreover, the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCg), a green tea-derived molecule which shares the ability with PCK3145 to inhibit MMP secretion [16, 17] and which receptor was identified as the non-integrin 67-kDa laminin receptor (67LR) [18] was also tested. We show that labelled-laminin bound to the cell surface of HT-1080 cells by the shift in fluorescence (Fig.3a, control). Interestingly, while excess non-labelled laminin (Fig.3a, Laminin) and PCK3145 (Fig.3a, PCK3145) effectively competed for respectively 30% and 45% inhibition (Fig.3b) with that binding of labelled-laminin, we found that EGCg was a very potent agent to inhibit biotin-labeled laminin cell surface binding by 80% (Fig.3a, EGCg). The observed partial inhibitory effect of PCK3145 may be due to the fact that laminin can bind to multiple cell surface receptors from integrins and non-integrins family, while PCK3145 may rather bind to a more specific cell surface laminin receptor. Whether the 67LR is involved in recognizing PCK3145 was next investigated.

*Cell adhesion to PCK3145 is induced in 67-kDa laminin receptor-transfected cells.* In order to characterize the potential involvement of the 67LR protein in interacting with PCK3145, we designed an adhesion assay to PCK3145-coated dishes. Native HT-1080 cells were dislodged by trypsinization and seeded on top of culture dishes that were coated with increasing concentrations of PCK3145. We found that HT-1080 cells recognized and adhered to PCK3145-coated dishes with a maximal adhesion found at 10  $\mu\text{g/ml}$  of PCK3145 (Fig.4a). Interestingly, although higher concentrations of PCK3145 still triggered significant cell adhesion, it was however gradually decreasing. Whether this binding to PCK3145 involved the 67LR was next investigated by transiently transfecting HT-1080 cells with the 67LR plasmid cDNA. Using mock versus 67LR-transfected cells, we observed that while basal cell adhesion remained unaffected, an increase in adhesion to PCK3145 occurred

when cells overexpressed the recombinant 67LR protein (Fig.4b). Immunoblotting was used to show that efficient expression of the recombinant 67LR protein was generated (Fig.4c, insert), and increase in cell adhesion monitored in time (Fig.4c).

*PCK3145 induces a rapid but transient phosphorylation of ERK.* Ligand binding to laminin receptors induces the activation of many intracellular pathways [19]. We next tested which potential intracellular pathways are activated by PCK3145 potential binding to the cell surface. We performed a gene-reporter assay as described in the methods section in order to monitor the activity of eukaryotic promoters and enhancers that are triggered by PCK3145. We show that PCK3145 significantly triggers two pathways : the MAPK/ERK pathway (SRE) and the NFkB pathway (Fig.5a, black bars). The 6.6-fold increase in the MAPK/ERK pathway is extremely strong as compared to that of the NFkB pathway (3.5-fold). The latter however potentially suggests the involvement of pro-apoptotic pathways that would be triggered by PCK3145 and that we previously reported in our *in vivo* model [5]. PCK3145 induction of the MAPK pathway is further confirmed by the rapid and transient induction of ERK phosphorylation (Fig.5b) peaking at 1 minute while total ERK levels remained unaffected (Fig.5b and 5c). Finally, the effects of PCK3145 were also compared to those of a scrambled peptide which was unable to induce ERK phosphorylation as PCK3145 did (not shown). This rapid and transient effect of PCK3145 suggests that a "hit-and-run" mechanism of action be envisioned.

*Laminin and laminin-derived peptide SIKVAV antagonize PCK3145-induced ERK phosphorylation and inhibitory action on MMP-9 secretion.* In order to confirm the transduction mechanism involved in PCK3145 inhibitory action on MMP-9 secretion, we treated HT-1080 cells with either the native laminin-1 protein or with a laminin-1-derived peptide SIKVAV. The latter is known for its capacity to induce MMP-9 secretion [20]. Confluent serum-starved cells were treated with these agents in the presence or not of 300 µg/ml PCK3145 for 24 hrs. Conditioned media was isolated and gelatin zymography performed to monitor the extent of MMP-9 extracellular levels. Results show that PCK3145 was indeed able to inhibit by 50% MMP-9 extracellular levels (Fig.6a, control).



Interestingly, SIKVAV-induced MMP-9 secretion was also antagonized by PCK3145 (Fig.6b), while native laminin-1 inhibited PCK3145 inhibitory action on MMP-9 secretion (Fig.6b). Finally, PCK3145-induced ERK phosphorylation was also monitored in the presence of laminin-1 and laminin-1-derived peptide SIKVAV. We show that ERK phosphorylation is completely inhibited by the presence of native laminin or SIKVAV (Fig.6c). Collectively, these results are strong evidence that laminin and laminin-derived peptides interfere with PCK3145 intracellular signaling and subsequent MMP-9 secretion inhibitory actions.

*PCK3145 inhibits the gene and protein expression of the MMP-9 mRNA stabilizing factor HuR.* A missing link between laminin and MMP-9 expression still hampers any elucidation of the potential mechanism of action of PCK3145. Recent studies suggested that MMP-9 expression be induced through a stabilizing nuclear factor HuR [21], and that  $\alpha_3\beta_1$  integrin, an integrin known to bind laminin, regulated MMP-9 mRNA [22]. These published evidence link HuR, an mRNA stabilizing factor that is ubiquitously expressed and that has the ability to bind to AU-rich elements (AREs) and prevent mRNA degradation. Interestingly, AREs are expressed in the 3'-untranslated region of MMP-9 [21, 23]. Whether PCK3145 regulates HuR expression was tested. Serum-starved cells were treated with PCK3145 in the presence or not of laminin or SIKVAV, and cells harvested for either RNA extraction or cell homogenates. RT-PCR revealed that HuR gene expression was indeed downregulated by PCK3145 and that both laminin and laminin-derived peptide SIKVAV antagonized PCK3145's inhibitory effect (Fig.7a). This was further confirmed independently with specific anti-HuR antibody and immunodetection (Fig.7b). Furthermore, treatment of the cells with PD98059, a MEK inhibitor, completely reversed the inhibition of HuR expression by PCK3145 (Fig.7c). This effect of PCK3145 on HuR may partly explain the inhibition of MMP-9 expression and subsequent diminished extracellular levels.

## DISCUSSION

MMP-9 is a matrix metalloproteinase involved in prostate cancer progression and which expression can be regulated at several levels. Although most published studies have focused on transcriptional control of MMP-9, there is increasing evidence that its expression can also be regulated at the steps of mRNA stability, translation and protein secretion. The ability to modulate MMP-9 expression at multiple steps through distinct signaling pathways may be particularly important during malignant conversion and metastasis, when tumor cells need to induce or maintain MMP-9 levels in response to changing environmental cues. While PCK3145, a 15-mer peptide derived from PSP94, does not affect MMP-9 enzymatic activity *per se*, we show that it however significantly reduces its gene expression which, consequently, leads to decreased extracellular MMP-9 secreted levels [24, this study]. We believe that we are now able to integrate the recently obtained experimental data on the mechanism of action of PCK3145 into a cohesive model linking cell surface laminin binding activities, CD44 cell surface expression modulation and MMP-9 secretion all linked to the metastatic process (Fig.8).

The novel laminin receptor-mediated regulation of MMP-9 expression mechanism of action of PCK3145 provides solid foundation to our hypothesis that PCK3145 acts through receptor-mediated signaling. Further investigations into the molecular basis of laminin receptor-mediated tumor progression may help unravel new targets for PCK3145. For instance, increased expression of the 67LR has been reported in a variety of human carcinomas (colon, breast, stomach, liver, and ovary) and directly correlates with a higher proliferation rate of malignant cells and tendency to metastasize [25]. In addition, the 67LR is detectable in anaplastic large cell lymphomas and in small subsets of high-grade B-cell non-Hodgkin's or Hodgkin's lymphomas [26], and the detection of the 67LR in prostate cancer biopsies has been proposed to act as a predictor of recurrence after radical prostatectomy [27]. Moreover, expression of the 67LR has been found to mediate acute myeloid leukemia cell adhesion to laminin and to frequently be associated with monocytic differentiation [28]. In light of these documented expression of the 67LR, it is thus tempting

to suggest that alternate cancers, or cancers at specific stage of development, such as monocytic-oriented acute myeloid leukemia, could potentially be efficiently targeted by PCK3145.

Our data suggest that intracellular signaling by PCK3145, that leads to the inhibition of MMP-9 extracellular levels, is mediated through cell surface laminin receptor-like activity such as that transduced by the 67LR. This is re-enforced by the unexpected observation that PCK3145 shares, to some extent, homology with different structural chain precursors of laminin including alpha-2, alpha-5, and beta-1 chains (not shown), which characteristic suggests that PCK3145 may also share the potential to interact with common cell surface receptors. Interestingly, EGCg, a green tea catechin that similarly to PCK3145 inhibits MMP-9 secretion, is also a 67LR ligand that antagonized cell binding to PCK3145. This confirms that such cell surface receptors may regulate PCK3145 effects. The partial inhibition of the cell surface laminin binding by PCK3145 however suggests the potential involvement of other cell surface laminin receptors. Undoubtedly, our data support that PCK3145 cell signaling, at least through ERK phosphorylation, involves laminin receptors.

We have identified HuR, a MMP-9 mRNA stabilizing factor, to be targeted by PCK3145. Indeed, both of its gene and protein expression were downregulated by PCK3145, and this downregulation was reversed by laminin receptor ligands. PCK3145 can thus be viewed as a laminin receptor-mediated signal transduction inhibitor. Whether alternate intracellular signaling are involved in PCK3145 actions still remains to be investigated although RhoA- and ERK-induced pathways have been highlighted [8, this study]. As HuR also binds to the AU-rich elements of RNAs encoding genes for cytokines, growth factors, tumor suppressor genes, proto-oncogene, and cell cycle regulators, one can envision that downregulation of HuR by PCK3145 may also inhibit cell proliferation or induce apoptosis. These alternate cellular processes are currently under investigation.

PCK3145 may transduce its intracellular HuR inhibitory effects through the binding of specific cell surface receptors of non-integrin origin such as the 67LR. Such PCK3145

intracellular transducing events involve ERK and previous studies have interestingly demonstrated similar cooperativity between integrins and growth factor receptors in the regulation of MAPK signaling pathways. For example, growth factor-dependent induction of ERK signaling in NIH 3T3 cells is strongly dependent on integrin-mediated cell adhesion where the activation of MEK/ERK signaling was identified as an adhesion-dependent event. Our model (Fig.8) suggests a distinct novel mechanism whereby cell surface laminin receptor-like activities can cooperate with ECM protein stimuli to induce MEK/ERK expression that could potentially be targeted by PCK3145.

The recently conducted phase IIa clinical trial with PCK3145 confirmed its therapeutic safety and tolerability for HRPC [6]. Interestingly, this effect was in part correlated to a marked reduction in the high levels of plasma MMP-9 (values above 100  $\mu\text{g/ml}$ ), suggesting a biological effect possibly related to control metastasis. Although we have already characterized some of the potential antiangiogenic and antimetastatic properties of PCK3145 [7, 8], the present study provides the first molecular clue for the potential mechanism of action of PCK3145 against prostate cancer tumor growth and metastasis. The identification of the cell surface laminin receptor activities involved in the transduction of PCK3145 intracellular actions may now help extend the future applications of that therapeutic peptide against other types of cancer in which high levels of MMP-9 and/or laminin receptor expression is associated.

*Acknowledgments* : B.A. holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Drs Michel Demeule and Christian Ché for the purification of biotin-labeled PCK3145 by FPLC.

## REFERENCES

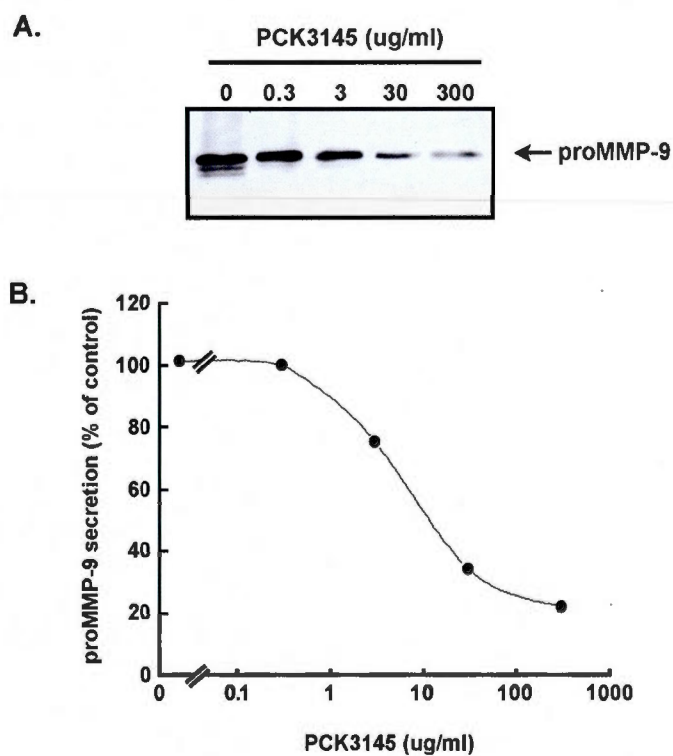
1. Yang JP, Finkelman MA, Clarke MW. Detection of PSP94 and its specific binding sites in the prostate adenocarcinoma cell line LNCaP. *J Urol* 1998; 160:2240-4.
2. Abrahamsson PA, Lilja H. Three predominant prostatic proteins. *Andrologia* 1990; 22:122-31.
3. Sakai H, Tsurusaki T, Kanda S, Koji T, Xuan JW, Saito Y. Prognostic significance of  $\beta$ -microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer. *Prostate* 1999; 38:278-84.
4. Shukeir N, Arakelian A, Kadhim S, Garde S, Rabbani SA. Prostate secretory protein PSP94 decreases tumor growth and hypercalcemia of malignancy in a syngenic *in vivo* model of prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63:2072-8.
5. Shukeir N, Arakelian A, Chen G, Garde S, Ruiz M, Panchal C, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res* 2004; 64:5370-7.
6. Hawkins RE, Daigneault L, Cowan R, Griffiths R, Panchal C, Armstrong A, et al. Safety and tolerability of PCK3145, a synthetic peptide derived from prostate secretory protein 94 (PSP94) in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2005; 4:91-9.
7. Lamy S, Ruiz MT, Wisniewski J, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, et al. A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 antagonizes VEGF signaling in endothelial cells: Implication in tumor angiogenesis. *International J Cancer* (in press)
8. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Ruitz MT, Wisniewski J, Garde S, et al. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding : Implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22:429-39.
9. Silver FH, Trelstad RL. Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments. *J Biol Chem*. 1980; 255:9427-33.
10. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem*. 1996; 271:8144-51.
11. Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N, Delbecchi L, Hardy J, Béliveau R. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery* 1999; 45:1432-40.

- 12 Rigot V, Lehmann M, Andre F, Daemi N, Marvaldi J, Luis J. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *J Cell Sci* 1998; 111:3119-27.
- 13 Plant NJ, Ogg M, Crowder M, Gibson GG. Control and statistical analysis of in vitro reporter gene assays. *Analytical Biochemistry* 2000; 278:170-4.
- 14 Wang JM, Hishinuma A, Oppenheim JJ, Matsushima K. Studies of binding and internalization of human recombinant monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by monocytic cells. *Cytokine*. 1993; 5:264-75.
- 15 Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Béliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:21888-96.
- 16 Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-gagnon N, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Inhibition of MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1542:209-20.
- 17 Dell'Aica I, Dona M, Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface. *Lab Invest*. 2002; 82:1685-93.
- 18 Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11:380-1.
- 19 Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett*. 2005; 223:1-10.
- 20 Freitas VM, Scheremeta B, Hoffman MP, Jaeger RG. Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. *Oral Oncol*. 2004; 40:483-9.
- 21 Huwiler A, Akool el-S, Aschrafi A, Hamada FM, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem*. 2003; 278:51758-69.
- 22 Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM. Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci*. 2005; 118:1185-95.
- 23 Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, et al. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by



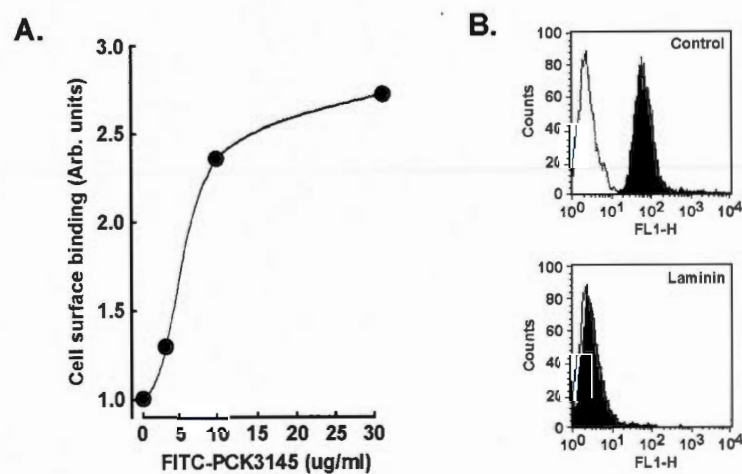
- inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:4901-16.
- 24 Garde S, Shukeir N, Arakelian A, Chen G, Morin C, Forté A, et al. Inhibition of angiogenesis and MMP-9 production by a synthetic peptide (PCK3145) in a syngeneic model of rat prostate cancer results in decreased tumor growth and skeletal metastasis *in vitro* and *in vivo*. 2005; AACR Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).
  - 25 Menard S, Tagliabue E, Colnaghi MI. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 52:137-45.
  - 26 Carbone A, Gloghini A, Colombatti A, Castronovo V, Menard S. Expression of the monomeric 67-kd laminin-binding protein in human lymphomas as defined by MLuC5 monoclonal antibody and paraffin section immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1995 May;26(5):541-6.
  - 27 Waltregny D, de Leval L, Coppens L, Youssef E, de Leval J, Castronovo V. Detection of the 67-kD laminin receptor in prostate cancer biopsies as a predictor of recurrence after radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2001; 40:495-503.
  - 28 Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, et al. Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:1465-72.

Fig.1



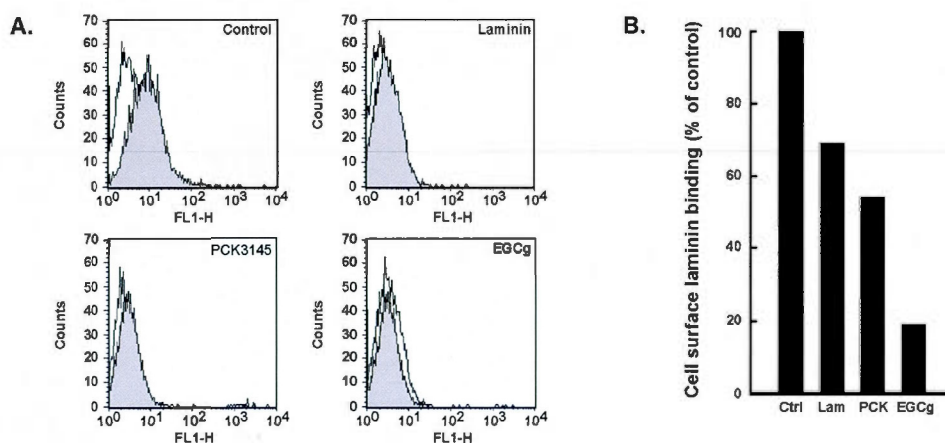
**Fig.1 : Extracellular MMP-9 levels are decreased in PCK3145-treated HT-1080 cells.** (A) HT-1080 fibrosarcoma cells were treated with increasing PCK3145 concentrations for 48 hrs in serum-free media. Equal volumes (300  $\mu$ l) of the conditioned media were TCA-precipitated and MMP-9 levels assessed by Western blotting and immunodetection with anti-MMP-9 antibody. (B) Quantification of a representative experiment is presented and was performed by scan densitometry.

Fig.2



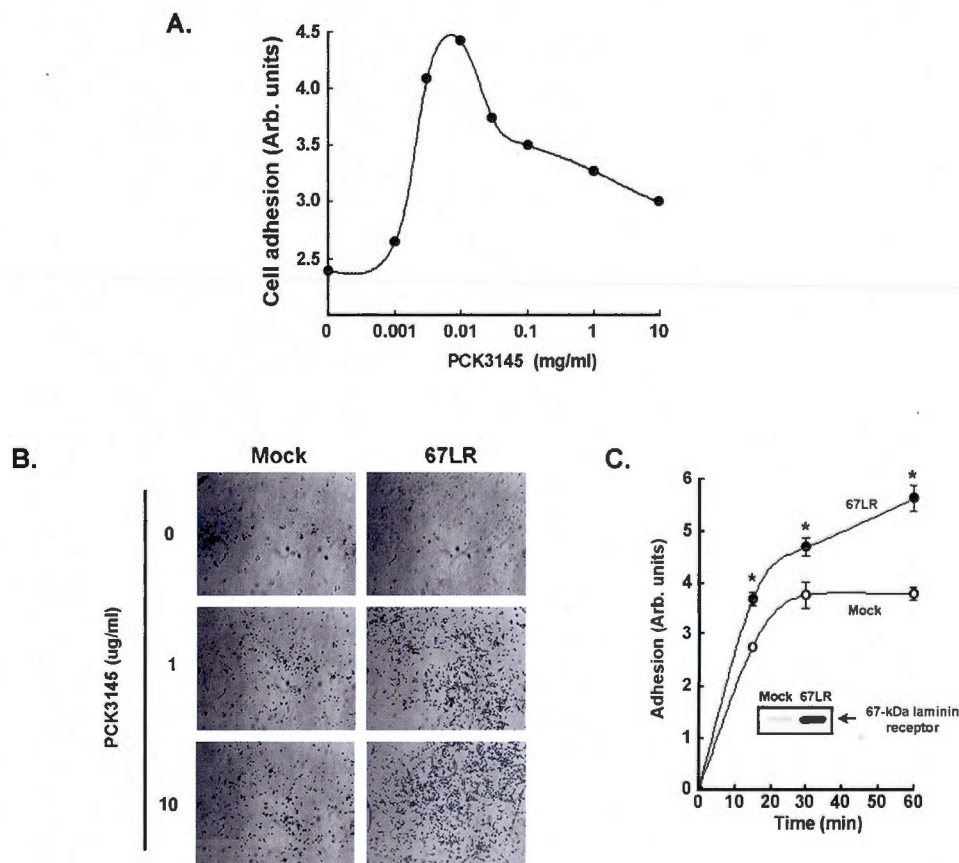
**Fig.2: Cell surface binding of PCK3145 is inhibited by laminin.** (A) HT-1080 fibrosarcoma cells were trypsinized and  $10^6$  cells incubated with increasing concentrations of N-terminal FITC-labelled PCK3145 for 1 hr at  $4^\circ\text{C}$ . Cell-associated fluorescence was measured by flow cytometry. (B) HT-1080 cells were incubated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of FITC-labeled PCK3145 alone (control) or in the presence of 30  $\mu\text{g/ml}$  laminin (laminin) and cell-associated fluorescence measured in the same conditions as above.

Fig.3



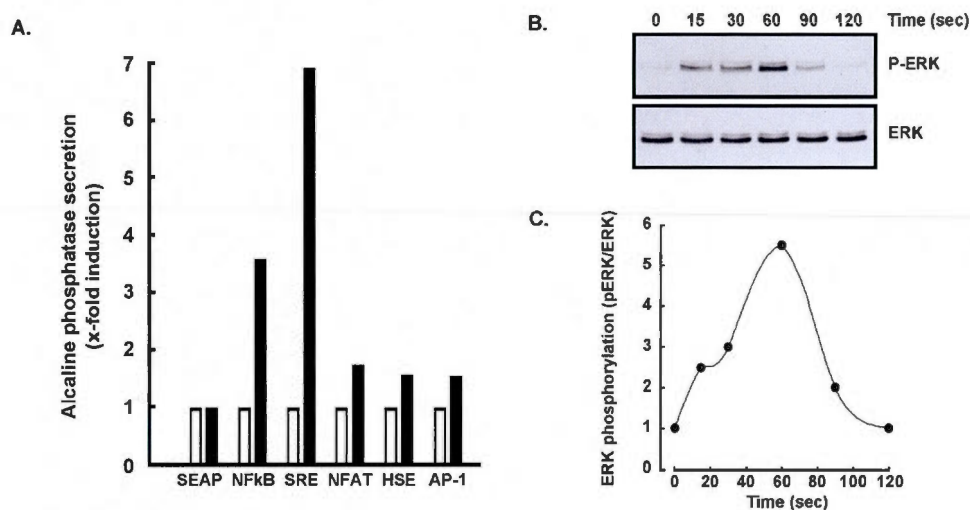
**Fig.3 : Cell surface binding of laminin is inhibited by PCK and by the green tea catechin EGCg.** (A) HT-1080 fibrosarcoma cells were trypsinized and  $10^6$  cells incubated with  $1 \mu\text{g/ml}$  biotin-labelled laminin (shaded plots) for 1 hr at  $4^\circ\text{C}$ . Cell-associated fluorescence was measured by flow cytometry as described in the methods section in the presence of  $30 \mu\text{g/ml}$  laminin (laminin),  $30 \mu\text{g/ml}$  PCK3145 (PCK3145), or in the presence of  $30 \mu\text{M}$  EGCg (EGCg). A representative experiment is presented and (B) quantification performed as described in the methods section.

Fig.4



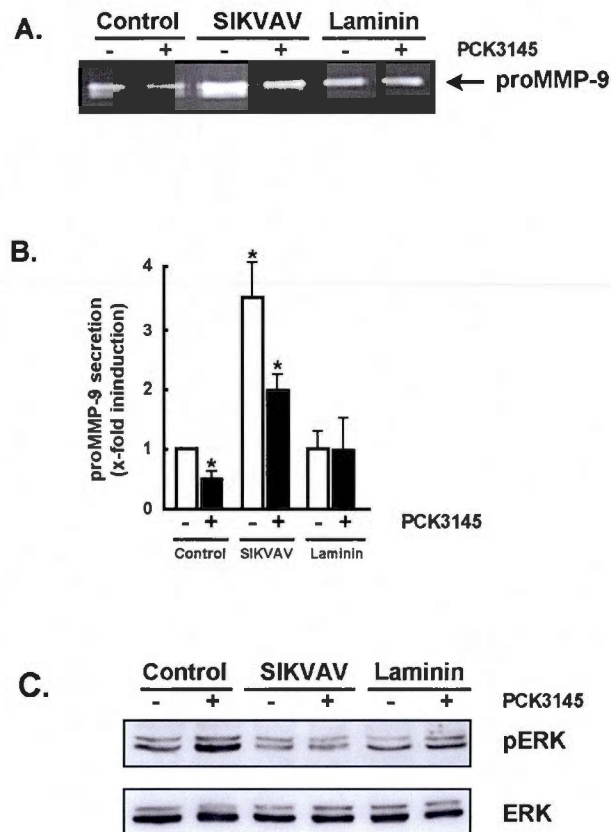
**Fig.4 : Cell adhesion to PCK3145 is increased in 67-kDa laminin receptor transfected cells.** (A) HT-1080 fibrosarcoma ( $25 \times 10^4$  cells / well) were seeded on top of  $1 \mu\text{g/ml}$  PCK3145-coated dishes. Cell adhesion was left to proceed for 1 hr and was quantified as described in the methods section. (B) Control (Mock) or 67LR-transfected HT-1080 cells were seeded on PCK3145-coated dishes and left to adhere. Representative pictures are taken and show increased adhesion to PCK3145 when the 67LR is overexpressed. (C) A time course of cell adhesion to  $1 \mu\text{g/ml}$  PCK3145 shows a rapid and significant increase in 67LR-transfected cells. A representative immunodetection of the 67LR precursor is shown (insert).

Fig.5



**Fig.5 : PCK3145 transduces its intracellular effects through the MAPK pathway.** (A) HT-1080 cells were transfected with cDNA plasmids encoding the following transcription factors binding elements : nuclear factor of activated T-cells (NFAT), nuclear factor of kB-cells (NFkB), serum responsive element (SRE), calcineurin/protein kinase C element (NFAT), heat shock element (HSE) and activator protein-1 (AP-1). Cells were then treated with 300  $\mu$ g/ml of PCK3145 for 24 hrs, and secreted alkaline phosphatase assessed in the media as described in the methods section. (B) Overnight serum-starved quiescent HT-1080 cells were incubated with vehicle (phosphate-buffered saline, PBS) or 300  $\mu$ g/ml PCK3145 for up to 2 min at 37°C. The cells were scraped from the culture dishes in PBS containing NaF/Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and incubated in the same medium buffer for 1 hr at 4°C. The resulting lysates were further clarified by centrifugation. Western blotting and immunodetection using anti-phospho-ERK and anti-ERK antibodies was then performed. (C) The extent of ERK phosphorylation in a representative experiment was assessed by scanning densitometry.

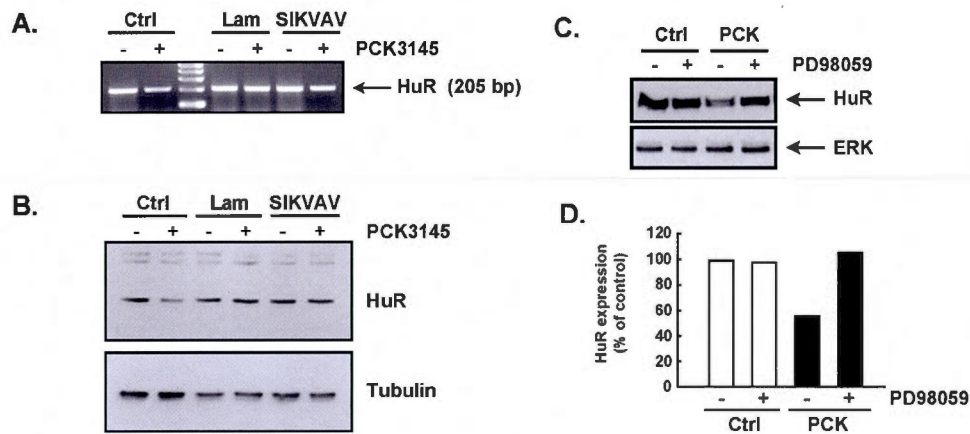
Fig.6



**Fig.6 : Laminin and laminin-derived peptide SIKVAV antagonize PCK3145-induced ERK phosphorylation and inhibitory action on MMP-9 secretion.** (A) Serum-starved HT-1080 cells were treated with either 300  $\mu\text{g/ml}$  PCK3145, 30  $\mu\text{g/ml}$  SIKVAV, 30  $\mu\text{g/ml}$  laminin, or a combination of SIKVAV and laminin. ProMMP-9 levels in the conditioned media were assessed by gelatin zymography as described in the methods section. (B) A mean of three experiments was quantified by scanning densitometry in non-treated (white bars) and PCK3145-treated (black bars) cells. (C) The extent of ERK phosphorylation was monitored at 1 minute of incubation as described in the legend of Fig.5.

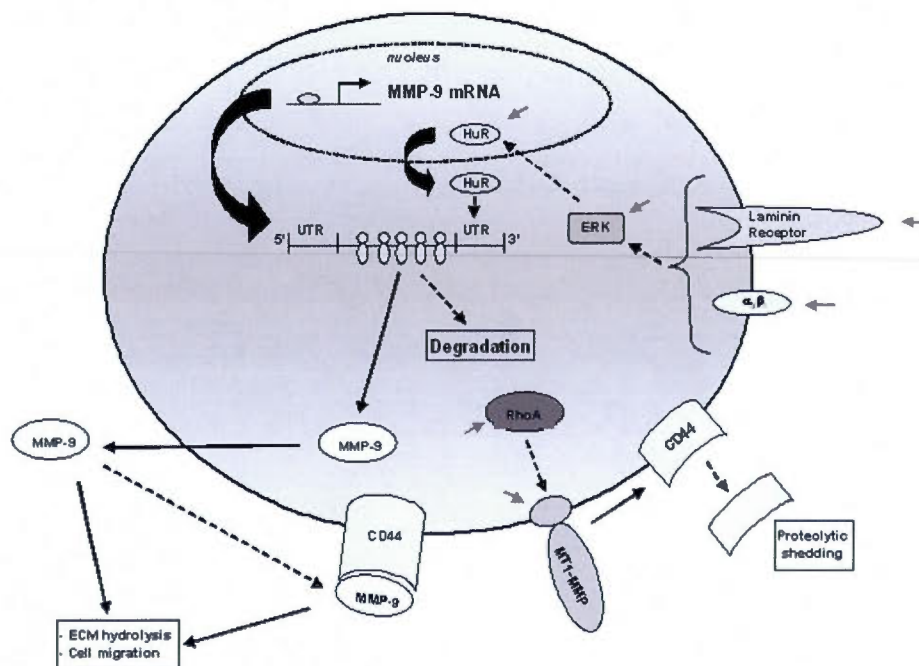


Fig.7



**Fig.7 : Laminin and laminin-derived peptide SIKVAV antagonize PCK3145 effect on HuR expression.** (A) HT-1080 cells were treated with 300  $\mu$ g/ml PCK3145 in the presence or not of laminin or laminin-derived peptide SIKVAV for 24 hrs. Total RNA was extracted and RT-PCR performed in order to assess HuR gene expression as described in the methods section. (B) Cell lysates from treated cells were used to monitor HuR protein expression by westernblotting. Tubulin expression was used as an internal control. (C) Cells were treated with PCK3145 in the presence or not of PD98059, a MEK kinase pharmacological inhibitor. HuR and ERK protein expression was assessed by western blotting as above. (D) Densitometric quantification of HuR protein expression was performed in order to assess the extent of PCK3145 effect (black bars) in the presence or not of PD98059.

Fig.8



**Fig.8: Integrative model of the combined anti-metastatic effects of PCK3145 on cancer cells.** In light of our results, we propose that PCK3145 transduces its inhibitory effect on MMP-9 secretion, and subsequent downregulation of HuR gene and protein expression, through some laminin cell surface binding activity. We have characterized the implication of the 67LR as one of the potential cell surface receptors for PCK3145. However, we can not exclude the implication of alternate laminin binding activities such as that of  $\alpha_3\beta_1$  integrin which was recently also reported to regulate HuR expression [22]. HuR downregulation by PCK3145 will favor the degradation of MMP-9 mRNA levels. We also provide evidence for a rapid and transient activation of ERK by PCK3145 that relay the signaling regulating HuR expression and subsequent MMP-9 extracellular levels. A secondary regulation mechanism of MMP-9 functions was also recently reported by us [8], whereas CD44, the docking receptor for extracellular MMP-9, was proteolytically shed from the cell surface through a RhoA/MT1-MMP mechanism [8]. Collectively, as indicated by the arrows, we have highlighted the multilevel molecular mechanism of action of PCK3145 that we believe are involved in its anti-metastatic effects.

**3.3 “Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg.”**

Annabi B., Currie JC., Moghrabi A. & Béliveau R.

*Leukemia Research*; 2007, 31: 1285-1292

La contribution de l’auteur de ce Mémoire pour la réalisation de cet article a été au niveau de la participation à la rédaction de l’article et au niveau de l’expérimentation : presque la totalité des expériences ont été réalisées par cet auteur.

L’auteur du Mémoire est deuxième auteur de cet article

**L'inhibition de l'expression de HuR et de MMP-9 dans les cellules myéloïdes leucémiques HL-60 différenciées en macrophage par les catéchines du thé vert.**

Borhane Annabi<sup>1</sup>, Jean-Christophe Currie<sup>1</sup>, Albert Moghrabi<sup>2</sup> and Richard Béliveau<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre BIOMED, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>2</sup>Division of Hematology-Oncology, Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, <sup>3</sup>Laboratoire de Médecine Moléculaire de l'Hôpital Sainte-Justine, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Montreal, Quebec, Canada

L'expression de la métalloprotéinase de la matrice MMP-9 est liée à la différenciation cellulaire myéloïde, en plus de l'inflammation et des processus angiogéniques associés à la progression du cancer. La sécrétion de MMP-9 et la différenciation cellulaire des cellules myéloïdes leucémiques HL-60 en cellules de type macrophage est induite par l'agent promoteur de tumeur PMA. Les effets chimiopréventifs des catéchines du thé vert épigallacatéchine gallate, catéchine gallate et épicatechine gallate, mais pas les catéchines manquant le groupement gallate en position 3', inhibent la sécrétion de MMP-9 d'une manière dépendante de la dose et du temps. L'expression génique et protéique de MMP-9 et de HuR, une protéine pouvant lier et stabiliser l'ARNm de la MMP-9, sont également inhibées tandis que celle du récepteur de la laminine à 67-kDa demeure in affectée. Nos résultats suggèrent que certaines catéchines spécifiques pourraient aider à optimiser les protocoles de traitements chimiothérapeutiques actuels contre la leucémie.

**Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG**

Borhane Annabi<sup>1</sup>, Jean-Christophe Currie<sup>1</sup>, Albert Moghrabi<sup>2</sup> and Richard Béliveau<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre BIOMED, Université du Québec à Montréal, Montréal, Quebec, Canada, <sup>2</sup>Division of Hematology-Oncology, Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Quebec, Canada, <sup>3</sup>Laboratoire de Médecine Moléculaire de l'Hôpital Sainte-Justine, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Montréal, Quebec, Canada

Matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression is linked with myeloid cell differentiation, as well as inflammation and angiogenesis processes related to cancer progression. MMP-9 secretion and macrophage-like HL-60 myeloid leukemia cells differentiation were triggered by the tumor-promoting agent PMA. The chemopreventive effects of green tea catechins epigallocatechin-gallate, catechin-gallate, and epicatechin-gallate, but not those catechins that lack a 3'-galloyl group, inhibited in a time- and dose-dependent manner MMP-9 secretion. The gene and protein expression of MMP-9 and of the mRNA stabilizing factor HuR were also inhibited, while that of the 67-kDa laminin receptor remained unaffected. Specific catechins may help optimize current chemotherapeutic treatment protocols for leukemia.

*Running title : Green tea inhibits MMP-9 in leukemia cells*

*Key words : Leukemia, chemoprevention, chemotherapy, green tea, MMP-9, HuR*

---

## INTRODUCTION

Chemotherapy for the treatment of several types of neoplastic disease has been one of the success stories of medicine. Unfortunately, the chemotherapeutic treatment outcome of various hematological disorders, including most adult acute promyelocytic leukemia (APL) and acute myeloid leukemia (AML), remains unacceptable [1]. Among the latter, the development of resistance to a wide spectrum of cytotoxic drugs frequently impedes AML's successful treatment [2]. Hence, novel avenues for the treatment of leukemia are required. Considerable attention has recently been focused on identifying naturally occurring chemopreventive substances capable of inhibiting, retarding, or reversing multi-stage carcinogenesis [3]. In fact, it has been demonstrated that some edible phytochemicals alter gene expression, directly or indirectly, thereby regulating carcinogenic processes.

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg), a principal antioxidant derived from green tea, is one of the most extensively investigated chemopreventive phytochemicals [4]. EGCg has been shown to block each stage of carcinogenesis by modulating the signal transduction pathways involved in cell proliferation, transformation, inflammation, apoptosis, metastasis and invasion [5]. Moreover, its anti-angiogenic properties make it a good candidate for targeting tumor-associated neovascularization [6]. Since the inclusion of antiangiogenic drugs into treatment protocols for leukemia and for hematologic malignancies is becoming an important task for future clinical studies [7, 8], we sought to investigate the *in vitro*, molecular effects of the antiangiogenic and chemopreventive properties of green tea catechins on the macrophage/monocyte differentiation processes in myeloid leukemia cells.

Among the several leukemic cell lines that have been established over the years, the human promyelocytic HL-60 leukemia cells were derived from the peripheral blood of a patient with APL [9], and have proven useful in understanding the process whereby immature cells differentiate into cells of distinct mature myelomonocytic lineages. In particular, HL-60 cells can be induced to differentiate into mature functional macrophage-monocyte-like cells by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  and by cytosine arabinoside (Ara-C)



[10]. Tumor-promoting agents, particularly the protein kinase C (PKC) activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, also known as TPA), have also long been known to induce HL-60 cell macrophage differentiation [11] via signal transduction processes in which PKC- $\beta$  plays an essential role as a binding site for PMA [12]. Macrophage differentiation has also been shown to involve secretion and activation of collagenase MMP-9 [13], a crucial matrix metalloproteinase involved in extracellular matrix (ECM) degradation during tumor metastasis and in inflammatory disorders [14]. Although most published studies have focused on the transcriptional control of MMP-9 expression, there is increasing evidence that its expression can also be regulated at the levels of mRNA stability, translation and protein secretion. The ability to modulate MMP-9 expression at multiple steps through distinct signaling pathways may be particularly important during malignant conversion and metastasis, when tumor cells need to induce or maintain MMP-9 levels in response to changing environmental cues. Among the nuclear factors shown to stabilize and augment the expression of MMP-9 mRNA [15], HuR has been ascribed a pivotal role in the development of tumors [16] and been found to be a key mediator during macrophage activation in PMA-differentiated HL-60 cells [17].

Since an important aspect in inflammation and tumor progression is the involvement of the inflammatory response mediated by tumor-associated macrophages (TAM) [18], and since polyphenols have been suggested to regulate the antitumorigenic properties of TAM [19], we investigated the chemopreventive effects of green tea catechins on the mechanisms regulating MMP-9 secretion in PMA-induced macrophage-like HL-60 myeloid leukemia cells.

## MATERIALS AND METHODS

*Materials.* Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against the 37-kDa laminin receptor precursor (37LRP) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and HuR was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All the green tea-derived catechins tested and other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

*Cell culture:* The HL-60 promyelocytic cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco Invitrogen Cell Culture Systems, Burlington, ON) containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Slides of PMA-treated HL-60 cells were mounted for light microscopy and air-dried, stained with Diff-Quick (Baxter Healthcare Corp., Miami, FL) and examined for morulae.

*Total RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis :* Total RNA was extracted from cultured HL-60 cells using the TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON). One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen). Primers for 67LR (forward : 5'-TGCAACAACAAGGGAGCTCAC-3', reverse : 5'-TCCATCAACCATTTTCCAT-3'), for HuR (forward : 5'-TCGCAGCTGTACCACTCGCCAG-3', reverse : 5'-CCAAACATCTGCCAGAGGATC-3') and for MMP-9 (forward : 5'-AAGATGCTGCTGTTTCAGCGGG-3', reverse : 5'-GTCCTCAGGGCACTGCAGGAT-3') were all derived from human sequences. PCR

conditions were optimized so that the gene products were examined during the exponential phase of their amplification and the products were resolved on 1.5% agarose gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

*Immunoblotting procedures and zymography* : Proteins from control and treated cells were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked with 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d’Urfée, QC). Gelatin zymography was used to assess the extent of MMP-9 activity. Briefly, an aliquot (40  $\mu$ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then renatured and stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

## RESULTS

### *PMA induces an invasive phenotype in macrophage-differentiated HL-60 cells.*

Among the agents who are well documented as inducing differentiation of HL-60 cells, the tumor-promoting agent phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) is thought to trigger a terminal differentiated monocytic/macrophage phenotype [11]. PMA treatment of serum-starved HL-60 cells partially induced an adhesive phenotype in these cells which originally remain in suspension (Fig.1A). This adhesive phenotype was accompanied by macrophage differentiation (Diff-quick staining, Fig1.A), and so was further investigated in light of the capacity of PMA to trigger MMP-9 secretion. HL-60 cells were treated (or not) with PMA in order to induce cell adhesion as described in the Methods section. The remaining cells, which did not adhere upon PMA treatment, were transferred into a fresh dish and MMP-9 secretion was monitored by gelatin zymography. While MMP-2 levels were very low to undetectable (not shown), those for MMP-9 were detected in basal secretion by HL-60 cells and were specifically induced by PMA in cells that adopted an adherent phenotype (Fig.1B). Total RNA was next isolated from untreated and from PMA-treated HL-60 cells and RT-PCR was performed in order to monitor MMP-9, the 67-kDa laminin receptor (67LR) and HuR gene expression levels. The results show that the 67LR gene expression was unaffected by PMA treatment and can thus be considered as an internal loading control (Fig.1C). In contrast, although HuR seemed to be unaffected in combined floating and adherent cells from control and PMA-treated cells (Tot, Fig.1C), it was significantly increased in the cells that adopted an adhesive phenotype upon PMA treatment. This is further confirmed by the increase in MMP-9 gene expression following PMA treatment that is shown in both the combined total floating and adherent cells as well as in the PMA-induced adherent HL-60 cells (Fig.1C). Finally, although no modulation in the 67LR gene expression was observed, we found that maturation of the 67LR protein from its 37-kDa laminin receptor precursor occurred upon PMA treatment of HL-60 cells, as was similarly observed in HT-1080 fibrosarcoma cells (Fig.1D). Altogether, these observations suggest that PMA triggers an invasive phenotype in HL-60 cells that is reflected by the increased capacity of the adherent cells to secrete MMP-9.

*EGCg inhibits HuR and MMP-9 gene expression during HL-60 cell transformation by PMA.* Recent reports have shown that EGCg, a green tea-derived catechin with chemopreventive properties, inhibited MMP-9 secretion in lung carcinoma and gastric cancer cells [20, 21]. This prompted us to investigate whether EGCg also inhibited MMP-9 secretion in PMA-treated HL-60 cells. Serum-starved HL-60 cells were treated with various doses of EGCg for 18 hours in the presence of PMA. Conditioned media was then harvested, and gelatin zymography performed to determine whether MMP-9 secretion was inhibited by EGCg (Fig.2A). Complete inhibition was observed at 10  $\mu$ M EGCg with an IC50 constant inhibition of  $3.2 \pm 0.7 \mu$ M (Fig.2B). In order to evaluate the respective contributions and sensitivity to EGCg of the macrophage-like adherent cells and of cells that remained in suspension after PMA treatment, total RNA was isolated from these two cell populations. Gene expression of MMP-9, HuR, and of the 67LR was assessed by RT-PCR. While the internal control 67LR gene expression remained unchanged, PMA induced HuR and MMP-9 expression significantly in adherent cells in comparison to the floating cells (Fig.2C). Furthermore, EGCg diminished the PMA-induced expression of both MMP-9 and HuR in adherent cells while it did not affect HuR or MMP-9 gene expression in floating cells (Fig.2C). Collectively, EGCg clearly targets the transformed cells that acquired adhesive and invasive properties.

*EGCg inhibits MMP-9 secretion in adherent, macrophage-like HL-60 cells.* While EGCg inhibition of MMP-9 gene expression was mostly attributable to the adherent transformed HL-60 cells, we assessed whether EGCg also targeted the terminally-differentiated HL-60 cells which now exhibit an adhesive and macrophage-like phenotype. PMA-induced differentiation was performed and the adherent cells were serum-starved in the presence or absence of EGCg for 12 hours. As shown by the gelatin zymography of the respective conditioned media (Fig.3A), the extent of MMP-9 secretion was significantly lowered by EGCg and represented only ~10% of the maximal secretion observed at 12 hours in untreated cells (Fig.3B). This shows that EGCg efficiently targets MMP-9 secretion in macrophage-differentiated HL-60 cells.

*EGCg inhibition of MMP-9 and HuR gene expression is synchronized in adherent, macrophage-like HL-60 cells.* In order to evaluate the potential contribution of HuR in the regulation of MMP-9 gene expression, we isolated total RNA from control and from EGCg-treated adherent HL-60 cells after different treatment periods. We performed RT-PCR and semi-quantitative analysis to assess the levels of HuR and MMP-9 gene expression. We show that MMP-9 and HuR gene expression remained relatively constant up to 12 hours (Fig.4, white circles). In contrast, EGCg treatment induced a synchronized and time-dependent decrease in both HuR and MMP-9 gene expression which started as soon as 3 hours after the treatment, and resulted in a 30-35% inhibition at 12 hours (Fig.4, black circles). This observation supports the possibility that the decrease in HuR expression may affect the stability of MMP-9, which would then lead to diminished synthesis and secretion of MMP-9.

*The galloyl group in the 3' position of green tea-derived catechins provides specificity in the inhibition HuR and MMP-9 expression.* Structure-function relationships have yet to be determined for the anti-cancer properties of several of the green tea-derived catechins. Interestingly, among the catechins present in green tea polyphenols, EGCg, epicatechin gallate (ECg) and catechin gallate (Cg) were found to be responsible for inhibiting P-gp which is involved in the multidrug resistance phenotype of cancer cells [22]. Furthermore, the most potent inhibitors of MMP catalytic activities were EGCg and ECg [23]. We have tested whether any three dimensional structural specificity could be found within the catechins with respect to inhibiting PMA-induced MMP-9 secretion in adherent HL-60 cells. We show that EGCg, Cg, and ECg all inhibited PMA-induced MMP-9 secretion in HL-60 cells, while epigallocatechin (EGC), catechin (C), and epicatechin (EC) had no effect (Fig.5A). The catechins which inhibited MMP-9 secretion also affected MMP-9 gene expression, but not that of the internal loading control 67LR (Fig.5B). The gallate moiety of the catechins tested thus seems to provide some specificity as to their MMP-9 secretion inhibition capacity. Cell lysates from adherent cells and from HL-60 cells that remained in suspension were also assessed for protein expression of HuR by Western

blotting and immunodetection. (Fig.5C). Similar inhibition pattern to the effect of the catechins bearing the gallate moiety on MMP-9 gene expression, HuR protein expression was also found to specifically decrease by 40-50% in adherent HL-60 cells treated with these catechins (Fig.5D). In contrast, HuR in those cells that remained in suspension was unaffected.



## DISCUSSION

Antiangiogenic agents which target the neovascularization process are being intensively investigated against various highly vascularized solid tumors [24]. In contrast, the rationale for the use of angiosuppressive therapy in hematological malignancies, and the status of novel antiangiogenic agents in clinical trials, particularly in leukemia, remain much less documented. The aim of our study was to assess the molecular impact of green tea-derived catechins on terminally-differentiated macrophage-like HL-60 myeloid leukemia cells, as several of these catechins have already been characterized for their anti-angiogenic properties [6, 25] and for their potential radiosensitizing effects [26, 27]. Here, we show that green tea catechins specifically containing a galloyl group in the 3' position effectively inhibited secretion of MMP-9, a process correlated with the acquisition of an invasive phenotype. Furthermore, we provide evidence that this inhibition mechanism involves destabilization of the MMP-9 transcript through reduced gene and protein expression of the MMP-9 mRNA stabilizing nuclear factor HuR.

One major impact of MMP secretion inhibition is in neuroinflammation, since MMP-9 secretion by macrophages and neutrophils could affect the integrity and lead to the breakdown of the blood-brain barrier [28]. We believe that the green tea catechin-mediated decrease in MMP-9 secretion from terminally macrophage-differentiated HL-60 cells might consequently impede their ability to migrate across the endothelium and may lead to decreased inflammatory infiltration. Interestingly, green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position have also been shown to inhibit tissue factor-induced thrombin generation [29], and to differentially regulate platelet aggregation [30]. Noteworthy, whether the 67-kDa laminin receptor (67LR), which was in fact found to be the EGCg cell surface receptor [31], provides the specificity and transduces the effects of the other catechins containing the galloyl group in the 3' position remains to be confirmed. In light of our results, it is however tempting to hypothesize that the interaction between the galloyl groups in the 3' position of catechins with the cell surface 67LR would be responsible for the specific downstream signaling.

Expression of the 67LR in AML cells is associated with monocytic differentiation since the 67LR expression strongly increased after PMA-induced monocytic differentiation of HL-60 cells [32]. Moreover, while the expression of the 67LR was undetectable in normal bone marrow hematopoietic cells, in precursor-B acute lymphoblastic leukemia, in chronic lymphocytic leukemia, and in chronic myeloid leukemia in chronic phase, it was significantly enhanced in 40% of 53 *de novo* AML, which frequently exhibited monocytic or myelomonocytic morphology and expressed CD14 and CD11a [32]. The involvement of the 67LR in transducing the intracellular signaling that regulates MMP-9 mRNA stability was highlighted in immortalized keratinocytes [33] and in prostatic adenocarcinoma [34]. In support to these findings, inhibition of MMP-9 secretion by PCK3145, an anti-angiogenic [35] and anti-metastatic [36] PSP94-derived peptide in phase IIa clinical trial against prostate cancer, was also recently found to require cell surface laminin receptor activity in order to inhibit HuR and MMP-9 expression [37]. Interestingly, the 67LR role in binding EGCg has led to the conclusion that the catechins C, EC, and EGC were unable to bind to the 67LR [31]. Unfortunately, the authors of that study failed to report any effects of those catechins that possessed an additional gallate moiety. It is thus unknown whether EGCg's alternate structural analogs that contain the gallate moiety also bind to the EGCg receptor.

Our finding that the 3' galloyl group of the green tea-derived catechins would provide interaction specificity and be responsible for the 67LR-mediated signaling responsible for the specific inhibition of HuR has relevance to several other HuR-dependent cellular processes. For instance, HuR levels are elevated in cancer [38], and have a pivotal role in promoting angiogenesis [39, 40]. Finally, HuR is thought to be a key mediator of posttranscriptional regulation and expression of the SLC11A1 gene, a solute carrier family 11 member 1 gene that plays an important role in macrophage activation in PMA-differentiated HL-60 cells [17]. It is tempting to suggest that these cellular processes, and the HuR-regulated expression of these markers, could be potential targets of green tea catechins. Whether any lowering of HuR by green tea catechins also contributes to cell death has yet to be investigated.

The role of angiogenesis in the growth and survival of leukemic cells has been recently demonstrated by showing that the progression of several forms of leukemia is related to the degree of angiogenesis [41]. Given that circulating inflammatory cells such as tumor associated macrophages (TAM), neutrophils and activated T lymphocytes can contribute to tumor angiogenesis by releasing MMP, and because the relationship between inflammatory cells and the process of cancer is well accepted [42], we believe that the anti-angiogenic and chemopreventive effects of specific green tea catechins may prove to be beneficial in targeting macrophage-like leukemia cells, help reduce tumor-associated inflammation to ultimately optimize current chemotherapeutic interventions.

*Acknowledgments* : BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research. RB holds an Institutional UQAM Research Chair in Cancer Prevention and Treatment.

*Authors contributions* : Annabi : Designed research, collected and analyzed data, wrote the paper, Currie : Performed experiments, collected the data, wrote the paper, Moghrabi : Analyzed the data, wrote the paper, Béliveau : Designed research, analyzed the data, wrote the paper

## REFERENCES

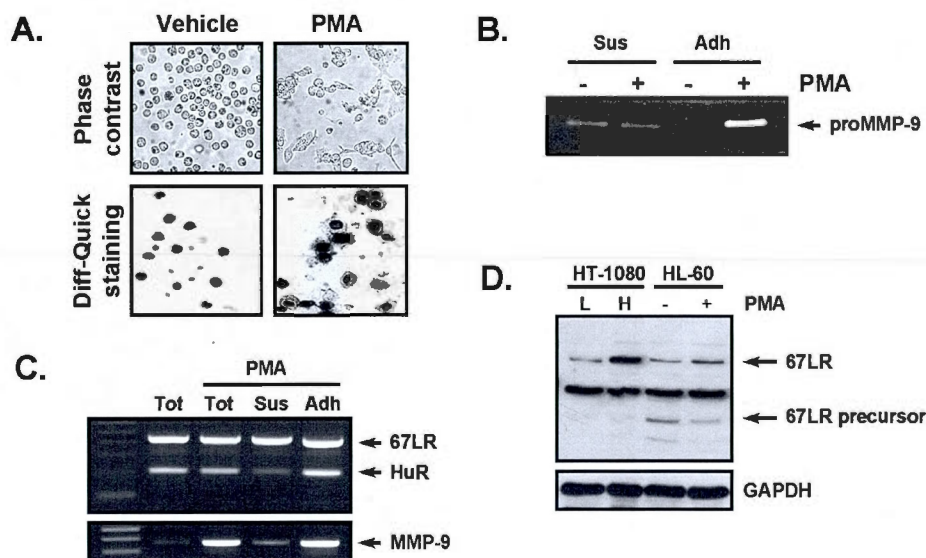
1. Larson RA, Daley GQ, Schiffer CA, Porcu P, Pui CH, Marie JP, Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA (2003) Treatment by design in leukemia, a meeting report, Philadelphia, Pennsylvania, December 2002. *Leukemia* 17:2358-2382
2. Tsuzuki S, Kitajima K, Nakano T, Glasow A, Zelent A, Enver T (2004) Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2. *Mol Cell Biol* 24:6824-6836
3. Surh Y (1999) Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 428:305-327
4. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 66:2500-2505
5. Na HK, Surh YJ (2006) Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol Nutr Food Res* 50:152-159
6. Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y, Beliveau R (2002) Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2:441-463
7. Thomas DA, Giles FJ, Cortes J, Albitar M, Kantarjian HM (2001) Antiangiogenic therapy in leukemia. *Acta Haematol* 106:190-207
8. Moehler TM, Hillengass J, Goldschmidt H, Ho AD (2004) Antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 10:1221-1234
9. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2458-2462
10. Griffin J, Munroe D, Major P, Kufe D (1982) Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. *Exp Hematol* 10:774-781
11. Huberman E, Callahan MF (1979) Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1293-1297
12. Tonetti DA, Henning-Chubb C, Yamanishi DT, Huberman E (1994) Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem* 269:23230-23235

13. Xie B, Laouar A, Huberman E (1998) Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor- $\alpha$  via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* 273:11583-11588
14. McMillan JJ, Weeks R, West JW, Bursten S, Rice GC, Lovett DH (1996) Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 67:523-531
15. Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 23:4901-4916
16. Audic Y, Hartley RS (2004) Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* 96:479-498
17. Xu YZ, Di Marco S, Gallouzi I, Rola-Pleszczynski M, Radzioch D (2005) RNA-binding protein HuR is required for stabilization of SLC11A1 mRNA and SLC11A1 protein expression. *Mol Cell Biol* 25:8139-8149
18. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196:254-265
19. D'Alessandro T, Prasain J, Benton MR, Botting N, Moore R, Darley-Usmar V, Patel R, Barnes S (2003) Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils. *J Nutr* 133:3773S-3777S
20. Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Shin BA, Ahn BW, Jung YD (2004) EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Res* 24:747-753
21. Yang J, Wei D, Liu J (2005) Repressions of MMP-9 expression and NF- $\kappa$ B localization are involved in inhibition of lung carcinoma 95-D cell invasion by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biomed Pharmacother* 59:98-103
22. Jodoin J, Demeule M, Beliveau R (2002) Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim Biophys Acta* 1542:149-159
23. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 1478:51-60
24. Yance DR Jr, Sagar SM (2006) Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther* 5:9-29

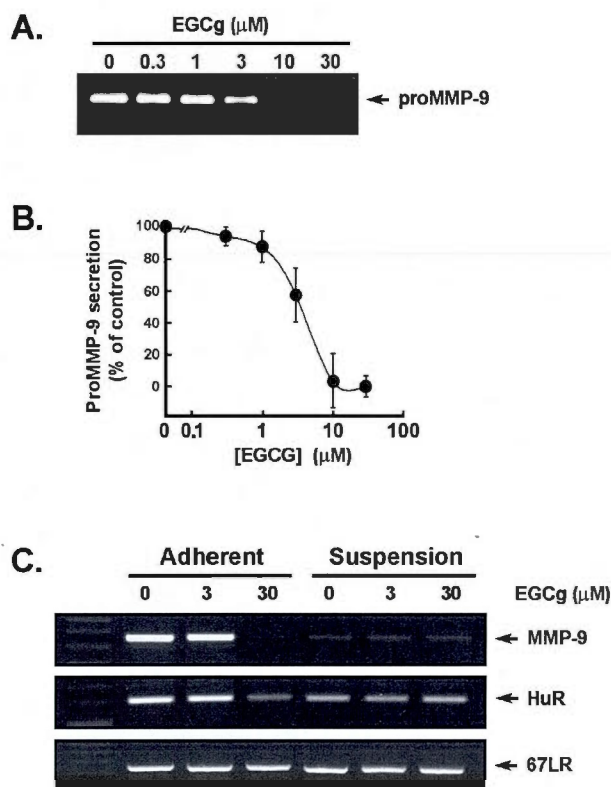
25. Lamy S, Gingras D, Beliveau R (2002) Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation *Cancer Res.* 62:381-385
26. Annabi B, Lee YT, Martel C, Pilorget A, Bahary JP, Beliveau R (2003) Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther* 2:642-649
27. Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB (2005) Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal* 7:1630-1647
28. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H558-H568
29. Stampfuss JJ, Schror K, Weber AA (2005) Green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position inhibit tissue factor-induced thrombin generation. *Thromb Haemost* 93:1200-1201
30. Lill G, Voit S, Schror K, Weber AA (2003) Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Lett* 546:265-270
31. Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K (2004) A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct Mol Biol* 11:380-381
32. Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, Rotoli B, Rossi G (1999) Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res* 5:1465-1472
33. Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM (2005) Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci* 118:1185-1195
34. Isisag A, Nese N, Ermete M, Lekili M, Ayhan S, Kandiloglu AR (2003) Col IV and Fn distribution in prostatic adenocarcinoma and correlation of 67LR, MMP-9 and TIMP-1 expression with Gleason score. *Anal Quant Cytol Histol* 25:263-272
35. Lamy S, Ruiz MT, Wisniewski J, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, Wu JJ, Annabi B. (2006) A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 118:2350-2358



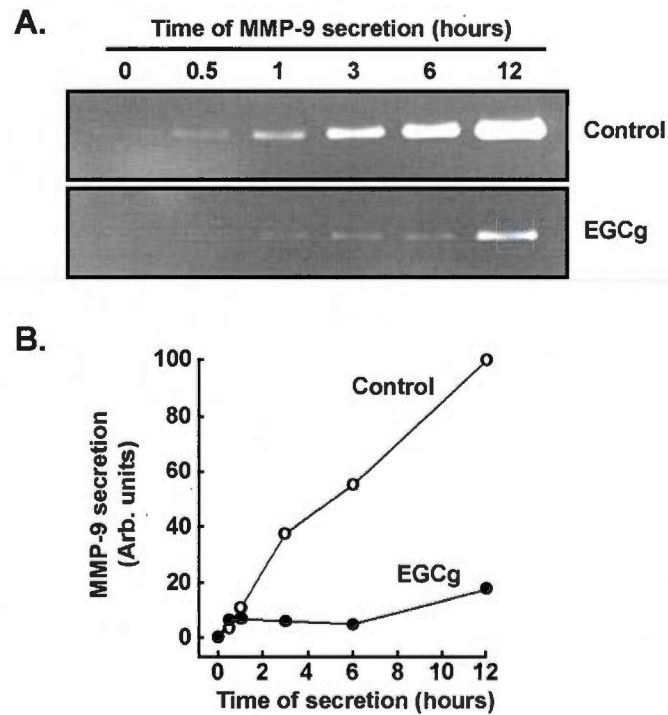
36. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Hawkins R, Dulude H, Daigneault L, Ruiz M, Wisniewski J, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, Wu JJ, Beliveau R (2005) A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 22:429-439
37. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Dulude H, Daigneault L, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, Wu JJ, Beliveau R (2006) Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling. *Anticancer Drugs* 17:429-438
38. Lopez de Silanes I, Fan J, Galban CJ, Spencer RG, Becker KG, Gorospe M (2004) Global analysis of HuR-regulated gene expression in colon cancer systems of reducing complexity. *Gene Expr* 12:49-59
39. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273:6417-6423
40. Sheflin LG, Zou AP, Spaulding SW (2004) Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 322:644-651
41. Ribatti D, Scavelli C, Roccaro AM, Crivellato E, Nic B, Vacca A (2004) Hematopoietic cancer and angiogenesis. *Stem Cells Dev* 13:484-495
42. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867

**Fig.1**

**Fig.1 : PMA induces an invasive phenotype in macrophage-like HL-60 cells.** HL-60 cells were cultured in suspension as described in the Methods section. Differentiation was induced in serum-starved HL-60 cells by the presence of 50 nM PMA for 18 hrs. (A) Phase contrast microscopy shows that PMA induced HL-60 cell adhesion (phase contrast, upper right panel) characterized by flattening and cell extensions once the floating cells were discarded. In contrast, untreated control cells remain uniformly round and in suspension (upper left panel). Diff-Quick staining (lower panels) shows morphological characteristics of mononuclear, adherent macrophages. (B) Conditioned media was extracted from adherent (Adh) and floating (Sus) cells in untreated and PMA-treated HL-60 cells, and subjected to gelatin zymography as described in the Methods section. (C) Total RNA was isolated from cells treated as in (B) and RT-PCR performed in order to evaluate the gene expression of 67LR, HuR, and MMP-9. (D) Western blotting was performed with total cell lysates of HT-1080 fibrosarcoma and HL-60 cells and immunodetection was performed with an anti-67LR antibody as described in the Methods section (the 67LR precursor has a MW of 37-kDa).

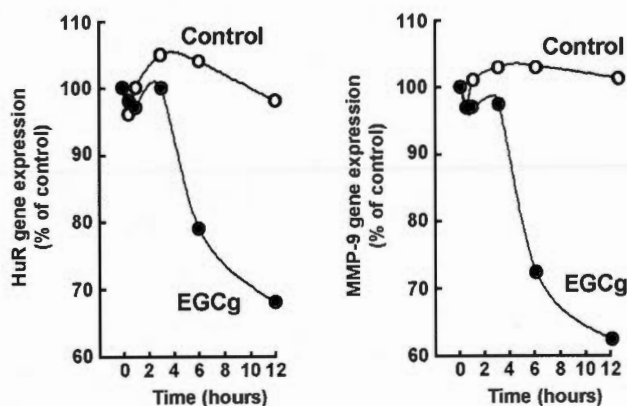
**Fig.2**

**Fig.2 : EGCg inhibits HuR and MMP-9 gene expression in adherent HL-60 cells.** (A) Serum-starved HL-60 cells were treated with 50 nM PMA in the presence of increasing concentrations of EGCg for 18 hrs. Conditioned media were collected and gelatin zymography performed. (B) Scanning densitometry was used to quantify the extent of gelatin hydrolysis, and the mean  $\pm$ SD are shown for three independent experiments. (C) Total RNA was extracted from PMA-treated HL-60 cells and RT-PCR performed to assess the extent of 67LR, HuR, and MMP-9 gene expression in adherent cells and cells that remained in suspension.

**Fig.3**

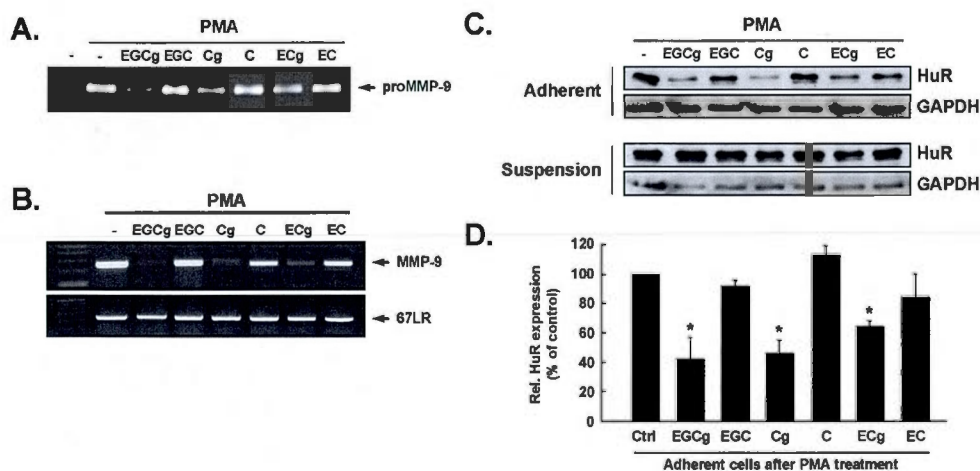
**Fig.3 : EGCg inhibits MMP-9 secretion in adherent macrophage-like HL-60 cells.** (A) HL-60 cells were treated with PMA for 18 hrs as described in the Methods section. Cells that remained in suspension were discarded and the adherent macrophage-differentiated cells were serum-starved in the presence or absence of 30  $\mu$ M EGCg for an additional 12 hrs. Conditioned media were collected and gelatin zymography performed as described in the Methods section. (B) Scanning densitometry was performed to assess the extent of gelatinolytic activity in control (open circles) and EGCg (closed circles) -treated cells, and is representative of 3 different experiments.

Fig.4



**Fig.4: EGCg inhibition of MMP-9 and HuR gene expression is synchronized in adherent macrophage-like HL-60 cells.** HL-60 cells were treated with PMA for 18 hrs as described in the Methods section. Cells that remained in suspension were discarded and the adherent macrophage-differentiated cells were serum-starved in the presence or absence of 30  $\mu$ M EGCg for an additional 12 hrs. Total RNA was isolated at the indicated times and RT-PCR performed as described in the Methods section. Scanning densitometry was performed on the amplicons to assess the extent of HuR and MMP-9 gene expression and is presented as the percent of control untreated cells. Control (open circles) and EGCg (closed circles) -treated cells are data representative of 3 different experiments.

Fig.5



**Fig.5 : The gallate moiety of green tea-derived catechins provides the specificity in the inhibition of HuR and MMP-9 expression.** (A) Serum-starved adherent macrophage-like HL-60 cells were treated with 3  $\mu$ M of green tea-derived catechins for 18 hrs. Conditioned media were collected and subjected to gelatin zymography. (B) Total RNA was extracted from adherent macrophage-like HL-60 cells and RT-PCR performed to assess the extent of 67LR and MMP-9 gene expression. (C) Cell lysates from adherent cells and from cells that remained in suspension after PMA treatment were harvested and 20  $\mu$ g of protein loaded onto SDS gels. Western blotting followed by an immunodetection of HuR or GAPDH was performed. (D) Scanning densitometry was performed on the bands reflecting green tea catechins effect on adherent cells only and the values represent the mean values  $\pm$ SD of three experiments.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le développement et la progression tumorale s'effectuent par des processus moléculaires et cellulaires complexes. La compréhension de ces étapes est donc primordiale au développement de traitements anti-cancéreux ciblés et adéquats et fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Les MMPs sont des protéases pouvant hydrolyser et remodeler la MEC. Les MMPs sont fréquemment associées à plusieurs étapes de la progression tumorale, telles l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Deryugina et Quiley, 2006). Récemment, des études ciblant le cancer de la prostate avancé et métastasé dans des modèles animaux et dans des études cliniques chez l'humain ont mis en évidence le potentiel d'efficacité thérapeutique du peptide PCK3145, un dérivé de la PSP94 (*Prostate Secretory Protein 94*) (Shukeir *et al.*, 2004; Hawkins *et al.*, 2005). L'étude clinique de phase IIa montre que l'une des activités biologiques anti-cancéreuses principales du PCK3145 agirait sur la réduction significative des niveaux plasmatiques de la MMP-9 chez les patients avec des niveaux élevés de cette enzyme avant le traitement (valeurs au-dessus de 100 µg/ml) (Hawkins *et al.*, 2005). De plus, les catéchines dérivés du thé vert possèdent plusieurs propriétés anti-cancéreuses et font également l'objet de nombreuses études (Beltz *et al.*, 2006). De par leurs nombreuses propriétés anti-cancéreuses, ces polyphénols du thé vert sont connues pour leur potentiel d'inhibition des MMPs, dont la MMP-9, dans plusieurs modèles tumoraux (Benelli *et al.*, 2002).

La surexpression de la MMP-9 est fréquemment corrélée à l'agressivité de certains cancers puisque cette métalloprotéinase participe à plusieurs étapes de la progression tumorale, incluant l'invasion, l'angiogénèse et la métastase de cellules tumorales (Deryugina et Quigley, 2006). Le PCK3145 et les catéchines du thé vert sont des agents pouvant inhiber



la MMP-9 mais le mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel ils agissent demeurent incompris. Ces agents anti-tumoraux partagent certaines similitudes dans leur mécanisme de régulation de la MMP-9 et celles-ci seront abordées dans la discussion de ce Mémoire. Nos travaux focalisent donc sur la compréhension des mécanismes d'action moléculaires permettant la régulation de la MMP-9 par les agents anti-tumoraux PCK3145 et les catéchines du thé vert dans les processus métastatiques.

Ces travaux ont été effectués en trois volets sous la forme de trois publications scientifiques distinctes. *Le premier volet* de notre recherche se penche sur les mécanismes de liaison et d'internalisation du PCK3145 à la surface cellulaire. Cette étude suggère l'implication des récepteurs de la laminine, particulièrement le précurseur au récepteur à la laminine de 37-kDa (37LRP), comme les récepteurs de surface cellulaire pouvant lier le PCK3145 et moduler ses effets anti-métastatiques. *Le deuxième volet* s'intéresse d'avantage au mécanisme de signalisation intracellulaire du PCK3145 menant à l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9. Nos données expérimentales suggèrent que la signalisation intracellulaire induite par le PCK3145 nécessite le récepteur à la laminine et permet la déstabilisation de l'ARNm MMP-9 via l'inhibition de la protéine HuR. *Le troisième et dernier volet* de notre recherche traite du mécanisme d'action de l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par les catéchines du thé vert. Ce mécanisme, similairement à celui du PCK3145, nécessite la liaison extracellulaire au récepteur à la laminine, le 67LR, puis mène à la déstabilisation du transcript de MMP-9 via une régulation à la baisse de la protéine HuR. L'ensemble de nos recherches vise donc à évaluer la contribution de HuR et du 67LR sur la régulation des fonctions de MMP-9 dans l'impact thérapeutique des catéchines du thé vert et du nouvel agent anti-tumorale le PCK3145.

#### **4.1 Le PCK3145 lie les récepteurs de la laminine en surface cellulaire pour moduler la sécrétion de la MMP-9**

Le premier volet de notre recherche, publié dans *Biochemical and Biophysical Research Communications* (p.66), porte sur les interactions de surface cellulaire du PCK3145 en se penchant principalement sur les propriétés de liaison et d'internalisation de ce peptide anti-métastatique. Cette étude nous a permis d'identifier les récepteurs de la

laminine, particulièrement le récepteur de la laminine à 67-kDa (67LR) ainsi que son précurseur de 37-kDa (37LRP), comme les récepteurs de surface cellulaire pouvant transduire les effets anti-métastatiques du PCK3145, telle l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9.

Nous avons tout d'abord effectué des essais de liaison et d'internalisation du PCK3145 afin de déterminer si certaines protéines spécifiques de la MEC, telles la laminine, l'acide hyaluronique (HA), le collagène de type-I et des peptides RGD, affectaient de manière différentielle les processus de liaison et d'internalisation du PCK3145. D'autres protéines de la MEC, telles la fibronectine, la fibrine, l'élastase et la vitronectine, ont été omises volontairement lors de cette expérience puisqu'une étude subséquente, réalisée par notre laboratoire, a démontré qu'elles n'interféraient pas avec les interactions des cellules avec le PCK3145 (Annabi *et al.*, 2005). La laminine et le HA inhibent la liaison cellulaire autant que l'internalisation du PCK3145. Toutefois, des protéines connues pour lier et interagir avec les récepteurs de la laminine, les peptides RGD et le collagène de type-I compétitionnent différemment avec la liaison de surface cellulaire et le processus d'internalisation du PCK3145. Le fait que le peptide RGD inhibe la liaison du PCK3145 en surface cellulaire mais n'affecte pas son internalisation suggère que ces deux processus surviennent par des mécanismes différents de surface cellulaire. Cette expérience suggère donc l'implication de plusieurs récepteurs de surface cellulaire dans la transduction des effets intracellulaires du PCK3145. De plus, ceci implique que le PCK3145 peut avoir des effets différentiels qui seraient dictés par la composition de la MEC. Toutefois, le PCK3145 partage, à un certain égard, des homologies de structure avec différentes chaînes précurseurs de la laminine, incluant  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  (Figure 1.11). Une autre expérience, évaluant l'affinité entre le PCK3145 et la cellule par cytométrie de flux, montre que la laminine abolit pratiquement totalement la liaison de surface cellulaire du PCK3145. Ces données suggèrent donc que le PCK3145 partage un potentiel d'interaction avec des récepteurs de surface cellulaire communs et soulève l'implication des récepteurs de la laminine comme les récepteurs cellulaires du PCK3145. Les effets biologiques de la laminine sont médiés par des récepteurs de la laminine divisés en deux groupes majeurs : les récepteurs intégrines et les autres (Tableau 1.2). Le récepteur de la laminine à 67-kDa (67LR), un récepteur de la

laminine non intégrine majeur, reconnaît plusieurs sites de liaison sur la laminine qui sont différents de ceux reconnus par les intégrines et lui confère ainsi, non seulement une affinité de liaison supérieure pour la laminine, mais également un éventail d'options de liaison et de signalisation (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005). Compte tenu que la laminine joue un rôle central dans la croissance, la différenciation et la migration cellulaire, l'interférence de ces fonctions, telle qu'observée par le PCK3145, pourrait mettre de l'avant les actions thérapeutiques potentielles de ce peptide (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2004).

Malgré le rôle potentiel de divers récepteurs de la laminine (intégrines ou autres) impliqués dans la régulation des effets du PCK3145, nos données expérimentales soutiennent fortement que le récepteur 37LRP/67LR de haute affinité pour la laminine joue un rôle majeur dans la liaison de ce peptide en surface cellulaire permettant ainsi la modulation des effets anti-métastatiques du PCK3145. Par le rôle récemment attribué au 67LR dans la régulation de la sécrétion de MMPs (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2004) ainsi qu'au fait que la laminine interfère avec les effets du PCK3145, nos essais de Far Western nous ont mené à l'identification du 37LRP, le précurseur de la protéine mature 67LR, comme une protéine de surface cellulaire candidate possédant une affinité de liaison pour le PCK3145. La surexpression de la protéine recombinante 37LRP et du 67LR nous a confirmé l'implication de cette protéine dans les processus de liaison cellulaire du PCK3145. Cependant, notre essai de Far Western a identifié d'autres candidats potentiels pouvant interagir avec le PCK3145. Toutefois, il est à noter que cet essai de liaison du ligand a été effectué avec un lysat total de cellules comprenant des protéines intracellulaires autant que des protéines provenant de la membrane cellulaire. L'identité de ces candidats potentiels possédant une affinité pour le PCK3145 demeure tout de même à être confirmée. Nos résultats suggèrent donc que d'autres protéines/récepteurs membranaires seraient possiblement impliqués dans les processus de liaison et d'internalisation du PCK3145. Toutefois, des 11 candidats identifiés en Far Western, nous croyons avoir clairement identifié le 37LRP/67LR comme un des récepteurs de surface cellulaire pouvant moduler les effets anti-métastatiques du PCK3145.

La confluence des cellules de fibrosarcomes humaines HT-1080 est un autre moyen par lequel nous pouvons surexprimer le 37LRP (Donaldson *et al.*, 2000). La confluence de ces cellules corrèle directement avec le niveau d'expression du 37LRP. Cet effet, probablement dû au contact entre cellules, nous permet alors l'obtention d'un modèle cellulaire pouvant exprimer différenciellement le 37LRP et nous permet d'étudier l'impact de ce récepteur comme modulateur des effets anti-métastatiques du PCK3145. La surexpression du 37LRP dans la population cellulaire de haute confluence mène à l'augmentation de la liaison surface cellulaire du PCK3145. Cette augmentation est comparable à celle préalablement mentionnée, observée lors de la surexpression de la protéine recombinante 37LRP obtenue par transfection. De plus, la compétition avec l'EGCg antagonise complètement la liaison de surface cellulaire du PCK3145 dans les cellules de hautes confluences surexprimant le 37LRP. L'EGCg, un polyphénol majeur du thé, est un ligand du 67LR (Tachibana *et al.*, 2004) et, similairement au PCK3145, inhibe la sécrétion de MMP-9 (Yun *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Également, le potentiel inhibiteur du PCK3145 sur la sécrétion de la MMP-9 est observé uniquement dans les cellules de haute confluence surexprimant le 37LRP. De même, une étude *in vivo* démontre que l'interférence avec les fonctions du 37LRP de cellules fibrosarcomes humaines HT-1080 limite leur habileté à métastaser dans un modèle murin (Narumi *et al.*, 1999). L'inhibition de l'interaction entre les cellules et la MEC ainsi que de la sécrétion de la MMP-9, deux processus associés à l'agressivité et au potentiel malin de cellules tumorales, sont des mécanismes par lesquels le PCK3145 exhiberait son activité thérapeutique anti-métastatique et, potentiellement, impliqueraient le 37LRP/67LR comme le récepteur de surface cellulaire pouvant moduler ces effets.

Nous pensons avoir clairement établi le rôle du 37LRP/67LR dans les processus de liaison en surface cellulaire du PCK3145. Toutefois, nous avons identifié d'autres protéines membranaires potentielles en Far Western possédant de l'affinité pour le PCK3145 et pouvant potentiellement moduler les effets du PCK3145. Également, l'augmentation de 5-6 fois l'expression de la protéine 37LRP dans la population HT-1080 de haute confluence mène uniquement à une augmentation de 25% de la liaison cellulaire du PCK3145. Toutefois, cette dernière pourrait possiblement être expliquée du fait qu'une sous-population

37LRP de surface cellulaire soit dans une mauvaise configuration et inefficace pour lier le PCK3145 ou qu'une forme mature du récepteur soit nécessaire pour favoriser davantage la liaison du peptide. Par contre, l'hypothèse que certaines intégrines possédant de l'affinité pour la laminine soient impliquées dans la régulation du PCK3145 ne peut être éliminée. Les intégrines et le 67LR agissent de concert dans la transduction des effets de la laminine. Toutefois, des informations limitées existent quant aux rôles spécifiques des différents récepteurs modulant les activités de la laminine. Il a été suggéré que le 67LR a comme fonction principale de stabiliser la liaison de la laminine pour les intégrines de surface agissant ainsi comme une molécule accessoire aux intégrines, mais cette hypothèse reste à confirmer (Menard, Tagliabue et Colnaghi, 1998; Ardini *et al.*, 1997). Des études montrent une association entre le 67LR et la sous-unité intégrine  $\alpha 6$  puisqu'ils sont co-exprimés et co-régulés dans les adénocarcinomes pancréatiques (Halatsch *et al.*, 1997) ainsi que dans les carcinomes du poumon à petites cellules (Pellegrini *et al.*, 1994). Par contre, d'autres études répertorient une expression différentielle et indépendante des deux récepteurs dans les carcinomes ovariens (Givant-Horwitz *et al.*, 2003) ainsi que dans les carcinomes hépatocellulaires humains (Ozaki *et al.*, 1998). Une étude *in vitro* montre une co-régulation et une association physique du 67LR et de la sous-unité intégrine  $\alpha 6$  (Ardini *et al.*, 1997) tandis qu'une autre infirme cette hypothèse (Gauczynski *et al.*, 2001). De plus, il a récemment été montré que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  module la stabilité du transcript de MMP-9 dans les kératinocytes immortalisés (Iyer, Pumiglia et DiPersio, 2005), un mécanisme de régulation des gènes de MMP dépendant des intégrines et similaire à celui du PCK3145 (abordé dans le deuxième volet de la discussion). Les intégrines liant la laminine pourraient donc potentiellement être impliquées dans la modulation des effets du PCK3145. Par contre, la transduction des effets intracellulaires par les intégrines, avec ou sans la collaboration du 67LR, devront faire l'objet de futures recherches.

L'ensemble des données expérimentales souligne le rôle du 37LRP/67LR comme le récepteur de surface cellulaire liant le PCK3145 mais ne nous permet pas de conclure sur son implication dans le processus d'internalisation. En effet, la surexpression du 37LRP dans les cellules HT-1080 augmente la liaison en surface cellulaire du PCK3145 mais n'affecte pas les processus d'internalisation de ce peptide sous nos conditions

expérimentales. Une étude récente montre que le 67LR serait impliqué dans les processus d'internalisation de certaines protéines et peptides, tels le CNF-1 (*Cytotoxic Necrotizing Factor-1*) (Kim, Chung et Kim, 2005). Ceci suggère que l'internalisation du PCK3145 nécessite soit la forme mature du 67LR ou emprunte un autre mécanisme de surface cellulaire pas encore caractérisé. Ces mécanismes d'internalisation pourraient s'effectuer via des récepteurs modulant l'endocytose suite à la liaison en surface cellulaire du PCK3145 à des récepteurs spécifiques ou par des mécanismes dépendants des clathérines ou des cavéoles. Ces hypothèses devront toutefois faire l'objet de plus amples recherches. De plus, l'implication du 37LRP et/ou du 67LR dans les processus d'internalisation du PCK3145 ne reste que spéculative à ce stade-ci puisque la relation entre le 67LR et le 37LRP n'est pas encore comprise. Toutefois, une explication plausible pourrait être que la formation d'un complexe 37LRP/67LR servirait de récepteur efficace permettant de moduler le processus d'endocytose tel qu'il le fait avec la protéine extracellulaire prion (Morel *et al.*, 2005; Gauczynski *et al.*, 2001). La présence d'un complexe fonctionnel 37LRP/67LR pourrait donc potentiellement être requis pour promouvoir davantage l'internalisation du PCK3145.

Le premier volet de notre étude nous a donc permis d'identifier les récepteurs de la laminine, particulièrement le 67LR ainsi que son précurseur le 37LRP, comme les récepteurs de surface cellulaire permettant la transduction des actions intracellulaires du PCK3145 et menant à l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9. Par conséquent, le PCK3145 pourrait s'avérer une avenue thérapeutique intéressante dans les cancers exprimant des récepteurs à la laminine et/ou ayant des niveaux élevés de MMP-9. L'augmentation de l'expression du 37LRP/67LR a été rapportée dans une variété de carcinomes (côlon, sein, estomac, foie et ovaire) puis corrèle directement avec une prolifération accrue des cellules malignes et la tendance à métastaser (Menard, Tagliabue et Colnaghi, 1998). De plus, le 67LR est détectable dans les lymphomes anaplasiques à petites cellules et dans une catégorie de lymphomes de cellules B Hodgkiniennes ou non-Hodgkiniennes de haut grade (Carbone *et al.*, 1995). Également, il a été montré que l'expression du 67LR module l'adhésion de cellules myéloïdes aigues leucémiques à la laminine et qu'elle est fréquemment associée avec la différenciation monocytique (Montuori *et al.*, 1999). À la lumière de ces profils d'expression du 67LR documentés, il est donc

tendant de suggérer que différents cancers, ou des stades spécifiques du développement du cancer tel dans l'orientation monocytique des cellules myéloïdes aigues leucémiques, pourraient potentiellement être efficacement ciblées par le PCK3145.

#### **4.2 L'inhibition de la sécrétion de MMP-9 par le PCK3145 cible la déstabilisation du transcript de MMP-9 via la signalisation intracellulaire de ERK modulée par les récepteurs de la laminine**

Le deuxième volet de notre recherche, publié dans *Anti-Cancer Drugs* (p.93), s'intéresse d'avantage aux mécanismes intracellulaires du PCK3145 menant à l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9. Nos données expérimentales suggèrent que la signalisation intracellulaire induite par le PCK3145 via les récepteurs de la laminine mène à la déstabilisation du transcript de MMP-9 suite à l'inhibition de la protéine cytoplasmique stabilisatrice de l'ARNm HuR. De plus, nous proposons dans cet article un modèle moléculaire de synthèse cohérent réunissant l'ensemble des données scientifiques provenant de travaux réalisés en grande partie par notre laboratoire et concernant le mécanisme d'action anti-métastatique du PCK3145.

Cet article renforce l'idée que la régulation de l'expression de la MMP-9 par le PCK3145 emprunte un mécanisme d'action nécessitant les récepteurs de la laminine et procure une base solide pour notre hypothèse selon laquelle le PCK3145 agit via une signalisation intracellulaire modulée par des récepteurs de surface. L'étude des processus de liaison en surface cellulaire du PCK3145 pouvant moduler ses effets anti-métastatiques (abordés dans le premier volet de la discussion de ce Mémoire) nous a mené à l'identification des récepteurs de la laminine. La liaison de ligands au récepteurs de la laminine induit l'activation de plusieurs voies intracellulaires (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005). Un essai de «gène rapporteur» nous a permis d'évaluer l'activité de promoteurs et d'activateurs déclenchée par le PCK3145 dans les cellules de fibrosarcomes humaines HT-1080. Nous montrons que le PCK3145 active significativement deux voies signalétiques, soit la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK (MEK/SRE) et la voie NF- $\kappa$ B. Toutefois, l'augmentation de 6.6 fois la voie de MAPK/ERK est très prononcée comparativement à celle observée pour la voie NF- $\kappa$ B (3.5 fois). Par contre, l'activation de



la voie NF- $\kappa$ B pourrait suggérer l'implication potentielle de voies pro-apoptotiques déclenchées par le PCK3145 telle que nous l'avons subséquemment rapporté dans une étude *in vivo* (Shukeir *et al.*, 2004). L'induction de la voie des MAPK par le PCK3145 est davantage confirmée par l'induction rapide et transitoire de la phosphorylation de ERK. Nos résultats montrent que la phosphorylation de ERK induite par le PCK3145 est complètement inhibée en présence de laminine-1 et du SIKVAV, un peptide dérivé de la laminine-1 connu pour sa capacité d'induire la sécrétion de la MMP-9 (Freitas *et al.*, 2004). De plus, l'induction de la sécrétion de MMP-9 par le SIKVAV est antagonisée par le PCK3145 et la laminine-1 renverse l'action inhibitrice du PCK3145 sur la sécrétion de MMP-9. Ceci ajoute au concept que le PCK3145 transduit ses effets intracellulaires à travers la liaison de récepteurs de surface cellulaire spécifique à la laminine, tel le 67LR. De tels événements de transduction intracellulaire impliquant ERK par le PCK3145 et d'autres études, ont montré, de manière intéressante, une coopérativité entre les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance dans la régulation des voies signalétiques des MAPK. Par exemple, l'induction de la signalisation via ERK par des facteurs de croissance dans les cellules de fibroblastes NIH 3T3 est fortement dépendante de l'adhésion cellulaire modulée par les intégrines où l'activation de la signalisation MEK/ERK a été identifiée comme un événement dépendant de l'adhésion (Aplin *et al.*, 2002). De plus, nous avons montré dans une étude antérieure que la signalisation intracellulaire via la voie MAPK/ERK modulait, du moins en partie, l'action anti-angiogénique du PCK3145 (Lamy *et al.*, 2006). Ceci est expliqué par l'interférence de l'activité tyrosine kinase associée soit avec la signalisation de VEGF via le VEGFR-2 dans les cellules endothéliales HUVEC, soit avec l'activité tyrosine kinase associée avec le PDGFR dans les cellules musculaires lisses PASM (Lamy *et al.*, 2006). Cette étude montre également que le PCK3145 inhibe la sécrétion de MMPs induite par le VEGF dans les cellules endothéliales. Enfin, cette étude suggère que les actions anti-angiogéniques du PCK3145 ne surviennent pas directement via le récepteur VEGFR-2 mais plutôt par un autre récepteur de surface cellulaire. L'implication des récepteurs de la laminine, tel le 67LR, dans les processus angiogéniques devront toutefois faire l'objet de recherches futures. À la lumière de ces observations, nous suggérons un mécanisme d'action dans lequel le PCK3145 exerce ses effets anti-métastatiques en ciblant les récepteurs de surface cellulaire à

la laminine qui coopèrent avec des stimuli protéiques de la MEC pour induire l'expression de MEK/ERK.

L'expression de la MMP-9, une métalloprotéinase corrélée à l'agressivité de plusieurs cancers et participant à plusieurs étapes de la progression tumorale (Deryugina et Quigley, 2006), peut être modulée à différents niveaux. Bien que la plupart des études publiées s'attardent sur le contrôle transcriptionnel de la MMP-9, de plus en plus d'information suggère que son expression peut aussi être modulée aux étapes de la stabilité de l'ARNm, la traduction et la sécrétion protéique. L'habileté de moduler l'expression de la MMP-9 à plusieurs étapes par des voies de signalisation distinctes pourrait donc s'avérer particulièrement importante durant la conversion maligne et la métastase lorsque les cellules tumorales doivent induire ou maintenir les niveaux de MMP-9 en réponse à différents changements environnementaux. Bien que nous avons souligné l'implication des récepteurs de la laminine comme récepteurs de surface cellulaire pouvant moduler les effets anti-métastatiques du PCK3145, un lien entre la laminine et l'expression de la MMP-9 manquait pour l'élucidation du mécanisme d'action potentiel du PCK3145. Des études récentes suggèrent que l'expression de la MMP-9 est induite par le facteur nucléaire stabilisateur HuR (Huwiler *et al.*, 2003; Akool *et al.*, 2003) et que l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$ , une intégrine connue pour lier la laminine, modulait l'ARNm de la MMP-9 (Iyer, Pumiglia et DiPersio, 2005). HuR est un facteur nucléaire stabilisateur de l'ARNm, ubiquitairement exprimé, qui possède l'habileté de lier les éléments riches en adénosine-uridine (*AU-rich elements*, ou AREs) et prévient la dégradation de l'ARNm. Ces AREs sont exprimés dans les régions non traduites en 3' de MMP-9 (Huwiler *et al.*, 2003; Akool *et al.*, 2003). Nos données expérimentales montrent que le PCK3145 inhibe l'expression génique et protéique de HuR. Cette inhibition de l'expression de HuR par le PCK3145 est antagonisée par la laminine-1 et le peptide dérivé de la laminine-1, SIKVAV. De plus, le traitement des cellules avec le PD98059, un inhibiteur de MEK, renverse complètement l'inhibition de l'expression de HuR par le PCK3145. Ces résultats suggèrent que la diminution des niveaux extracellulaires de MMP-9 par le PCK3145 survient, du moins en partie, via l'inhibition de l'expression de HuR. Cette baisse des niveaux de HuR déstabilise le transcript de MMP-9, mène à sa dégradation et diminue ainsi l'ARNm pouvant être traduite en protéines fonctionnelles MMP-9 destinées à

la sécrétion. De plus, nos données supportent que la signalisation cellulaire du PCK3145 modulant l'expression de HuR, du moins via la phosphorylation de ERK, impliquent les récepteurs de la laminine.

HuR lie l'ARNm de la MMP-9 mais peut également lier les ARES d'ARNm codant pour des gènes de cytokines, facteurs de croissance, gènes suppresseurs de tumeur, proto-oncogènes et des régulateurs du cycle cellulaire (Tableau 1.4). L'implication de HuR dans la modulation de ces différents facteurs nous laisse envisager que l'inhibition de son expression par le PCK3145 peut également inhiber la prolifération cellulaire ou induire l'apoptose. Ces processus alternatifs sont présentement sous investigation. Dans des études précédentes, nous avons déjà montré que l'induction de la sécrétion de MMP-9 par la cytokine inflammatoire TNF-alpha (Annabi *et al.*, 2005) et par le facteur de croissance VEGF (Lamy *et al.*, 2006) est inhibée par le PCK3145. Une autre étude montre que la stimulation de l'expression de la MMP-9 par le TNF-alpha via la voie MAPK/ERK s'effectuait de manière autocrine dans les cellules monocytiques leucémiques THP-1 (Heidinger *et al.*, 2006). Curieusement, HuR a été impliqué dans la régulation de l'expression du VEGF (Datta *et al.*, 2005) et du TNF-alpha (Rajasingh *et al.*, 2006). Toutefois, si le mécanisme de modulation de la MMP-9 par le PCK3145 joue physiologiquement sur l'inhibition de l'expression de ces (ou d'autres) molécules inductrices de la MMP-9 ou par l'interférence avec le mécanisme extra- ou intracellulaire par lequel elles agissent demeure à être confirmé. De plus, une des caractéristiques intéressante de HuR est qu'elle contient des séquences lui permettant de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Fan et Steitz, 1998). Il a déjà été suggéré que HuR lie les ARNm du noyau puis les escorte ensuite dans le cytoplasme, les protège ainsi de la dégradation (Gallouzi *et al.*, 2000). Les mécanismes de translocation du noyau vers le cytoplasme de HuR sont toutefois peu compris mais pourraient potentiellement être ciblés par le PCK3145.

Nous avons caractérisé le 67LR comme un récepteur de surface cellulaire potentiel du PCK3145. Toutefois, l'implication de d'autres récepteurs de la laminine, tel l'intégrine  $\alpha\beta 1$ , ne peut être éliminée dans la modulation des effets anti-métastatiques du PCK3145.

La régulation à la baisse de HuR va favoriser la dégradation de l'ARNm de MMP-9. De plus, nous montrons que l'activation rapide et transitoire de ERK par le PCK3145 est un relais signalétique crucial dans la régulation de l'expression de HuR et des niveaux extracellulaires de MMP-9. Nous avons également récemment proposé un second mécanisme de régulation des fonctions de MMP-9 où le CD44, un récepteur d'ancrage de la MMP-9 (Yu et Stamenkovic, 1999), est protéolytiquement clivé en surface cellulaire par un mécanisme dépendant de RhoA et de MT1-MMP limitant ainsi son association avec la MMP-9 (Annabi *et al.*, 2005). Une telle association entre CD44 avec MMP-9 a été suggérée de lier l'adhésion cellulaire avec une protéolyse péricellulaire (Yu et Stamenkovic, 1999) et de promouvoir l'invasion de cellules tumorales dans certains essais expérimentaux de métastases (Bourguignon *et al.*, 1998). De plus, la liaison de la MMP-9 au récepteur CD44 contribue à transformer la forme latente de TGF- $\beta$  en sa forme active et permettre ainsi la promotion d'un phénotype de dégradation et invasif (Yu et Stamenkovic, 2000; Danielpour, 2005). Il est donc tentant de suggérer qu'une conséquence biologique du PCK3145 dans les processus métastatiques, par son potentiel d'inhibition de la sécrétion de MMP-9 et de son ancrage subséquent à la membrane cellulaire, pourrait avoir un impact sur l'habileté du TGF- $\beta$  à promouvoir la progression maligne et la métastase dans les processus inflammatoires (Yu et Stamenkovic, 2000; Wahl *et al.*, 1993). De plus, les travaux présentés dans ce Mémoire nous ont permis d'identifier les récepteurs de la laminine en surface cellulaire, particulièrement le 67LR, impliqués dans la transduction des actions intracellulaires du PCK3145. Par conséquent, ceci pourrait maintenant nous aider au développement d'applications futures du peptide thérapeutique PCK3145 contre les cancers dans lesquels les niveaux de MMP-9 sont élevés et/ou l'expression de récepteurs de la laminine sont associés.

#### **4.3 L'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du thé vert s'effectue par des mécanismes similaires d'action**

Le troisième et dernier volet de notre recherche, publié dans *Leukemia Research* (p.122), s'est inspiré, en grande partie, du modèle moléculaire anti-métastatique du PCK3145 préalablement décrit dans ce Mémoire. Bien que les deux premiers volets

s'attardent principalement aux effets du PCK3145, ce volet se penche principalement sur le mécanisme de régulation des fonctions de la MMP-9 par les catéchines du thé vert.

L'utilisation du modèle cellulaire HL-60, des cellules promyélocyaires humaines leucémiques dérivées de sang périphérique d'un patient atteint de leucémie promyélocytaire aigue (LPA), nous a permis d'effectuer plusieurs parallèles entre le mécanisme d'action du PCK3145 et celui des catéchines du thé vert dans les processus de modulation des fonctions de la MMP-9. Le modèle cellulaire HL-60 s'est avéré très utile et a historiquement contribué à la compréhension du processus par lequel les cellules immatures se différencient en une lignée cellulaire myélomonocytaire mature distincte (Collins *et al.*, 1978). Des agents promoteurs de tumeurs, particulièrement l'activateur de la protéine kinase C, le PMA, sont connus pour induire la différenciation cellulaire des HL-60 en macrophages (Huberman et Callahan, 1979) via un processus de transduction de signal dans lequel la PKC- $\beta$  joue un rôle essentiel comme site de liaison du PMA (Tonetti *et al.*, 1994). Il a été montré que la différenciation macrophagique implique la sécrétion et l'activation de la MMP-9 (Xie, Laouar et Huberman, 1998), une MMP impliquée dans la dégradation de la MEC durant la métastase tumorale et dans les maladies inflammatoires (McMillan *et al.*, 1996). Des facteurs nucléaires montrés comme pouvant stabiliser et augmenter l'expression de l'ARNm de la MMP-9 (ce Mémoire; Akool *et al.*, 2003), on a attribué à HuR un rôle clé dans le développement de tumeurs (Audic et Hartley, 2004) et HuR a été identifié comme un médiateur clé durant l'activation des macrophages dans les cellules HL-60 différenciées par le PMA (Xu *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que l'expression du 67LR module l'adhésion de cellules myéloïdes aigues leucémiques à la laminine et qu'elle est fréquemment associée avec la différenciation monocytique (Montuori *et al.*, 1999). La réponse inflammatoire modulée par les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) est un aspect important impliqué dans l'inflammation et la progression tumorale (Bingle, Brown et Lewis, 2002; Lewis et Pollard, 2006). Par conséquent, puisqu'il a été suggéré que les polyphénols modulent les propriétés anti-tumorales des TAMs (D'Alessandro *et al.*, 2003), nous avons investigué les effets chimiopréventifs des catéchines du thé vert sur le mécanisme de régulation de la sécrétion de la MMP-9 dans les cellules de type macrophage

provenant de la différenciation cellulaire induite par le PMA des cellules myéloïdes leucémiques HL-60.

Nos résultats montrent que l'induction de la différenciation des cellules leucémiques HL-60 en cellules de type macrophage par le PMA entraîne un phénotype invasif caractérisé par l'augmentation de la sécrétion de MMP-9. Cette augmentation de la sécrétion de MMP-9 dans la population différenciée de type macrophage corrèle avec l'augmentation de l'expression génique de la MMP-9 ainsi que de HuR, une protéine stabilisatrice de l'ARNm de MMP-9. L'EGCg, une catéchine prédominante retrouvée dans le thé vert, est un des phytoéléments chimiopréventifs les plus étudiés (Khan *et al.*, 2006). Il a été montré que l'EGCg bloque plusieurs des étapes de la cancérogénèse par la modulation des voies de transduction de signaux impliquées dans la prolifération, transformation, inflammation, apoptose, métastase et l'invasion cellulaire (Na et Surh, 2006). De plus, ses propriétés anti-angiogéniques font de lui un bon candidat pour cibler la néovascularisation associée aux tumeurs (Demeule *et al.*, 2002). Nous montrons dans cet article que l'EGCg inhibe la sécrétion de MMP-9 induite lors de la différenciation cellulaire des HL-60 en macrophages par le PMA. De plus, l'EGCg module l'expression génique de MMP-9 et de HuR uniquement dans la population de cellules différenciées de type macrophage associées à la sécrétion accrue de MMP-9. Nous montrons également que la différenciation cellulaire des HL-60 par le PMA en une lignée de type macrophage induit la maturation du récepteur membranaire 67LR. De manière intéressante, le 67LR a été identifié comme le récepteur de l'EGCg (Tachibana *et al.*, 2004). La forme mature du 67LR, exprimée dans la population différenciée de type macrophage, pourrait donc expliquer la capacité inhibitrice de l'EGCg sur la sécrétion de MMP-9.

Bien que les effets bénéfiques de l'EGCg sont largement documentés, le lien entre les structures et les fonctions des propriétés anti-cancéreuses des autres catéchines dérivées du thé vert demeurent peu connus. Toutefois, des catéchines présentes dans les polyphénols du thé vert, une étude montre que l'EGCg, l'ECg et le Cg sont responsables de l'inhibition de la P-gp, une protéine responsable du phénotype de résistance pléiotropique aux médicaments dans les cellules tumorales (Jodoin, Demeule et Béliveau, 2002). De plus, l'EGCg et l'ECg



ont été identifiés comme les catéchines possédant un potentiel inhibiteur des plus marqué sur l'activité catalytique des MMPs (Demeule *et al.*, 2000). Notre étude montre que les catéchines du thé vert possédant un groupement gallate en position 3' inhibent la sécrétion de MMP-9 induite par le PMA dans la population différenciée de type macrophage. Cette spécificité d'action est également observée par l'inhibition de l'expression génique de MMP-9 ainsi que de l'expression protéique de HuR par l'EGCg, le ECg et le Cg tandis que leurs homologues (EGC, EC et C), ne possédant pas le groupement gallate en position 3', sont incapables de moduler ces effets. L'étude mentionnée précédemment et identifiant le 67LR comme le récepteur cellulaire de l'EGCg souligne que les catéchines EGC, EC et C ne possèdent pas d'affinité pour ce récepteur (Tachibana *et al.*, 2004). Par contre, les auteurs de cet article ne rapportent pas l'effet des autres catéchines possédant le groupement gallate en 3'. Il n'est donc pas encore connu si les différents analogues structuraux de l'EGCg possédant ce groupement gallate lient le 67LR. À la lumière de nos résultats, il est toutefois tentant de suggérer que l'interaction entre le groupement gallate en position 3' des catéchines et le 67LR soit responsable de la spécificité des actions intracellulaires transduites.

Bien que la majorité des études publiées s'attardent sur le contrôle transcriptionnel de la MMP-9, ce Mémoire vise davantage l'approfondissement des mécanismes de régulation de la MMP-9 au niveau de la stabilité de son ARNm qui mène à la traduction puis à la sécrétion de cette protéine. Nous montrons que la spécificité d'action observée dans l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par les catéchines gallates est corrélée avec l'inhibition l'expression protéique de HuR, une protéine stabilisatrice de l'ARNm de la MMP-9 (Huwiler *et al.*, 2003; Akool *et al.*, 2003), ainsi que de l'expression génique de MMP-9 dans la population de type macrophage exprimant la forme mature du 67LR. De plus, nous constatons que l'inhibition de l'expression génique de HuR et de MMP-9 par l'EGCg survient de manière synchronisée dans cette population cellulaire. Cette observation supporte la possibilité que la diminution de l'expression de HuR peut affecter la stabilité du transcript de MMP-9 ce qui mènerait alors à la diminution de la synthèse et de la sécrétion de MMP-9.



Nous devons toutefois envisager que l'inhibition de l'expression de HuR par les catéchines gallates puisse agir sur d'autres processus cellulaires puisque cette protéine nucléaire est exprimée de manière ubiquitaire et module différents événements cellulaires importants. Par exemple, il a été montré que HuR est un médiateur clé de la régulation postranscriptionnelle et de l'expression du gène *SLC11A1*, un gène qui joue un rôle important dans l'activation des macrophages dans les cellules HL-60 différenciées par le PMA (Xu *et al.*, 2005). Une autre étude suggère que l'activation de la production de la MMP-9 lors de la différenciation cellulaire des HL-60 en macrophages par le PMA s'effectue via une régulation autocrine par le TNF-alpha (Xie, Louar et Huberman, 1998). L'ARNm du TNF-alpha possède des AREs dans sa région non-traduite 3' et son expression peut également être modulé par HuR (Dean *et al.*, 2001). Si l'inhibition de l'expression de HuR par les catéchines gallates du thé vert entraîne l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 induite par le PMA dans les HL-60 via la déstabilisation du transcript de MMP-9 et/ou en empêchant l'induction de la MMP-9 par la cytokine pro-inflammatoire TNF-alpha demeure à être étudié. De plus, les niveaux de HuR sont fréquemment élevés dans les cancers (Lopez de Silanes *et al.*, 2004) et joue un rôle majeur dans la promotion de l'angiogénèse (Sheflin, Zou et Spaulding, 2004; Levy *et al.*, 1998). Il est donc tentant de suggérer que ces processus cellulaires, ainsi que l'expression des facteurs modulés par HuR, pourraient potentiellement être ciblés par les catéchines du thé vert. Des études sont présentement en cours afin d'évaluer si l'inhibition de l'expression de HuR par les catéchines du thé vert affecte les processus de mort ou de prolifération cellulaire.

Le rôle de l'angiogénèse dans la croissance et la survie de cellules leucémiques a récemment été soulevé en montrant que la progression de plusieurs formes de leucémie est reliée au degré d'angiogénèse (Ribatti *et al.*, 2004). De plus, la relation entre les cellules inflammatoires et le processus du cancer est maintenant bien acceptée, où les cellules inflammatoires telles les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les neutrophiles et les lymphocytes T activés peuvent contribuer à l'angiogénèse tumorale en sécrétant des MMPs (Coussens et Werb, 2002). Nous pensons donc que les effets anti-angiogéniques et chimiopréventifs des catéchines gallates du thé vert pourraient s'avérer bénéfiques en ciblant les cellules leucémiques de type macrophage et en diminuant l'inflammation

associée aux tumeurs pour ultimement optimiser les présentes interventions chimiothérapeutiques. De plus, puisque le mécanisme d'action de l'inhibition des fonctions de la MMP-9 par les catéchines du vert se rapproche étroitement avec celui du peptide PCK3145, il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique du PCK3145 dans ce modèle leucémique.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS

#### 5.1 Les perspectives thérapeutiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert dans la lutte contre le cancer

Les MMPs jouent un rôle cruciale dans l'invasion tumorale et dans la formation de métastases. Par conséquent, le développement d'agents thérapeutiques pouvant inhiber l'activité ou la synthèse de ces enzymes afin de prévenir ou de diminuer la progression des cancers est le centre d'attention de plusieurs chercheurs. Le développement d'inhibiteurs synthétiques des MMPs est une avenue thérapeutique présentement poursuivie et plusieurs de ces composés font ou ont fait l'objet d'études cliniques de phase II ou III (Overall et Kleinfeld, 2006). Les inhibiteurs des MMPs peuvent être divisés en trois catégories pharmacologiques : 1) les inhibiteurs peptidomimétiques (Batimastat, Marimastat) et non-peptidomimétiques (BAY 12-9566, AG3340, BMS-275291, CGS-27023A) du collagène; 2) les dérivés de la tétracycline (Doxycycline, Métastat); 3) les biphosphonates (Vihinen, Ala-aho et Kahari, 2005). Même si certains inhibiteurs des MMPs semblent prometteurs, plusieurs difficultés associées à la spécificité enzymatique, la libération, la stabilité et le taux de clairance du médicament, et à l'obtention de concentrations efficaces restent à être résolues (Vihinen, Ala-aho et Kahari, 2005; Overall et Kleinfeld, 2006). De plus, quelques complications sont survenues lors de l'utilisation de ces agents thérapeutiques dans les études cliniques dont l'aggravation de la maladie dans certains cas (Overall et Kleinfeld, 2006). Le manque de spécificité des ces drogues serait la cause première de ces complications puisque les MMPs, en plus de leur participation à la progression des cancers, sont impliquées dans la régulation de plusieurs systèmes physiologiques cruciaux dont le système immunitaire.

L'ensemble des recherches effectuées dans ce Mémoire vise à approfondir le mécanisme d'action des catéchines du thé vert et du peptide synthétique PCK3145 dans la modulation de la MMP-9. Les catéchines gallates du thé vert et le PCK3145 présentent de grandes similitudes dans leur mécanisme d'action de la régulation des fonctions de la MMP-9. De plus, comme les catéchines du thé vert (Na et Surh, 2006), on a attribué au PCK3145 des propriétés anti-angiogéniques (Lamy *et al.*, 2006) et anti-métastatiques (Annabi *et al.*, 2005). Ces deux agents anti-cancéreux inhibent la sécrétion de MMP-9 et requièrent des récepteurs de surface cellulaire possédant de l'affinité pour la laminine, particulièrement le 67LR, afin de transmettre leurs signaux intracellulaires menant ultimement à l'inhibition de l'expression de HuR et de MMP-9. La compréhension plus détaillée de ces mécanismes d'action nous permet donc d'évaluer l'étendue thérapeutique de ces agents anti-cancéreux. Nos résultats suggèrent donc que les catéchines gallates du thé vert et le peptide PCK3145 peuvent potentiellement cibler de manière efficace les cancers caractérisés par des niveaux élevés de MMP-9 et/ou du récepteur à la laminine. L'étude clinique de phase IIa a confirmé l'innocuité, la tolérabilité et l'efficacité préliminaire du PCK3145 (Hawkins *et al.*, 2005). Malgré le fait que le PCK3145 soit efficace, des modifications biochimiques de ce peptide, incluant la glycosylation, la conjugaison avec du polyéthylène glycol ou l'albumine, devraient limiter sa protéolyse, augmenter sa demi-vie, et pourraient potentiellement amplifier ses effets biologiques (Haubner *et al.*, 2001; Dennis *et al.*, 2002; Harris, Martin et Modi, 2001). Finalement, la combinaison du peptide PCK3145 et/ou des catéchines gallates du thé vert avec des agents de chimiothérapie à différentes doses et temps précis pourrait possiblement procurer des effets anti-cancéreux additifs ou synergiques qui permettraient d'ajouter à nos protocoles thérapeutiques actuels afin de réduire la morbidité et la mortalité de certains cancers.

En conclusion, nos recherches montrent que les mécanismes d'action empruntés dans l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du thé vert sont étroitement similaires. Ces agents anti-angiogéniques et anti-métastatiques nécessitent la liaison de récepteurs à la laminine en surface cellulaire, particulièrement le récepteur à la laminine de 67kDa, pour transduire leurs effets intracellulaires. Cette signalisation intracellulaire via la voie des MAPK/ERK mène à une régulation à la baisse de l'expression

de HuR, un facteur nucléaire qui lie et stabilise l'ARNm, puis à la dégradation du transcript de MMP-9. Cette dégradation diminue la traduction de l'ARNm en protéine synthétisée MMP-9 et, par ce fait, sa sécrétion subséquente.

Nos travaux éclairent les mécanismes d'action de l'inhibition de la sécrétion de la MMP-9 par le PCK3145 et les catéchines du vert et permettent donc d'établir une base solide pour cibler plus adéquatement certains types de cancers. Nous pensons que les propriétés anti-métastatiques du PCK3145 et des catéchines du thé vert peuvent être dirigées contre les tumeurs associées à des niveaux d'expression élevée de MMP-9 et/ou de récepteurs de la laminine, tels que retrouvés dans plusieurs leucémies et carcinomes.

## RÉFÉRENCES

- Abrahamsson P.A. et Lilja H. 1990. *Three predominant prostatic proteins*. *Andrologia*, 22:122-31.
- Aglund K., Rauvala M., Puistola U., Angstrom T., Turpeenniemi-Hujanen T., Zackrisson B. et Stendahl U. 2004. *Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and stage*. *Gynecol. Oncol.*, 3:699-704.
- Aina O.H., Sroka T.C., Chen M.L. et Lam K.S. 2002. *Therapeutic cancer targeting peptides*. *Biopolymers*, 66:184-99.
- Akool el-S., Kleinert H., Hamada F.M., Abdelwahab M.H., Forstermann U., Pfeilschifter J. et Eberhardt W. 2003. *Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR*. *Mol. Cell. Biol.*, 23:4901-4916.
- Allain, P. 2000. *Les médicaments*. 3<sup>ième</sup> éd. Médecine, Pharmacologie.
- Annabi B., Bouzeghrane M., Currie J.C., Dulude H., Daigneault L., Garde S., Rabbani S.A., Panchal C., Wu J.J. et Béliveau R. 2006. *Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling*. *Anticancer Drugs*, 17:429-438.
- Annabi B., Bouzeghrane M., Currie J.C., Hawkins R., Dulude H., Daigneault L., Ruiz M., Wisniewski J., Garde S., Rabbani S.A., Panchal C., Wu J.J. et Béliveau R. 2005. *A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis*. *Clin. Exp. Metastasis* 22:429-439.
- Annabi B., Lachambre M.P., Bousquet-gagnon N., Pagé M., Gingras D. et Béliveau R. 2002. *Inhibition of MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in glioblastoma cells*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1542:209-20.
- Annabi B., Lee Y.T., Martel C., Pilorget A., Bahary J.P. et Béliveau R. 2003a. *Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate*. *Cancer Biol. Ther.*, 2:642-649.
- Annabi B., Lee Y.T., Turcotte S., Naud E., Desrosiers R.R., Champagne M., Eliopoulos N., Galipeau J. et Béliveau R. 2003b. *Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation*. *Stem Cells*, 3:337-47.
- Annabi B., Naud E., Lee Y.T., Eliopoulos N. et Galipeau J. 2004b. *Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors*. *J. Cell. Biochem.*, 91:1146-58.

- Annabi B., Thibeault S., Moumdjian R. et Béliveau R. 2004a. *Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells*. J. Biol. Chem., 279:21888-96.
- Aplin A.E., Hogan B.P., Tomeu J. et Juliano R.L. 2002. *Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases*. J. Cell. Sci., 115:2781-90.
- Ardini E., Tagliabue E., Magnifico A., Buto S., Castronovo V., Colnaghi M.I. et Menard S. 1997. *Co-regulation and physical association of the 67-kDa monomeric laminin receptor and the alpha6beta4 integrin*. J. Biol. Chem., 4:2342-5.
- Audic Y. et Hartley R.S. 2004. *Post-transcriptional regulation in cancer*. Biol Cell 96:479-498.
- Aumailley M., Bruckner-Tuderman L., Carter W.G., Deutzmann R., Edgar D., Ekblom P., Engel J., Engvall E., Hohenester E., Jones J.C., et al. 2005. *A simplified laminin nomenclature*. Matrix Biol., 5:326-32.
- Aumailley M. et Smyth N. 1998. *The role of laminins in basement membrane function*. J. Anat., 1:1-21.
- Bajjal-Gupta M., Clarke M.W., Finkelman M.A., McLachlin C.M. et Han V.K. 2000. *Prostatic secretory protein (PSP94) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines*. J. Endocrinol., 165:425-33.
- Bajorath J. 2000. *Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions*. Proteins, 2:103-11.
- Baluna R.G., Eng T.Y. et Thomas C.R. 2006. *Adhesion molecules in radiotherapy*. Radiat. Res., 6:818-31.
- Bannikov G.A., Karelina T.V., Collier I.E., Marmer B.L. et Goldberg G.I. 2002. *Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide*. J. Biol. Chem., 277:16022-7.
- Barreau C., Paillard L. et Osborne H.B. 2005. *AU-rich elements and associated factors : are there unifying principles?* Nucleic Acids Res., 33:7138-50.
- Beaulieu E., Kachra Z., Mousseau N., Delbecchi L., Hardy J. et Béliveau R. 1999. *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors*. Neurosurgery, 45:1432-40.
- Beckman R.A et Loeb L.A. 2005. *Genetic instability in cancer : theory and experiment*. Semin. Cancer Biol., 6:423-35.



- Beltz L.A., Bayer D.K., Moss A.L. et Simet I.M. 2006. *Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols*. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 6:389-406.
- Benelli R., Vene R., Bisacchi D., Garbisa S. et Albini A. 2002. *Anti-invasive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a natural inhibitor of metallo and serine proteases*. *Biol. Chem.*, 383:101-5.
- Beppu M., Ikebe T. et Shirasuna K. 2002. *The inhibitory effects of immunosuppressive factors, dexamethasone and interleukin-4, on NF-kappaB-mediated protease production by oral cancer*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1586:11-22.
- Berno V., Porrini D., Castiglioni F., Campiglio M., Casalini P., Pupa S.M., Balsari A., Menard S. et Tagliabue E. 2005. *The 67 kDa laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1*. *Endocr. Relat. Cancer*, 12:393-406.
- Bertram J.S. 2000. *The molecular biology of cancer*. *Mol. Aspects Med.*, 6:167-223.
- Bhowmick N.A. et Moses H.L. 2005. *Tumor-stroma interactions*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1:97-101.
- Bignold L.P. 2004. *Chaotic genomes make chaotic cells: the mutator phenotype theory of carcinogenesis applied to clinicopathological relationships of solid tumors*. *Cancer Invest.*, 3:338-43.
- Bingle L., Brown N.J. et Lewis C.E. 2002. *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. *J. Pathol.*, 196:254-265.
- Bocchetta M. et Carbone M. 2004. *Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation*. *Oncogene*, 38:6484-91.
- Bode W., Fernandez-Catalan C., Tschesche H., Grams F., Nagase H. et Maskos K. 1999. *Structural properties of matrix metalloproteinases*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 4:639-52.
- Bosman F.T. et Stamenkovic I. 2003. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. *J. Pathol.*, 4:423-8.
- Bourguignon L.Y., Gunja-Smith Z., Iida N., Zhu H.B., Young L.J., Muller W.J. et Cardiff R.D. 1998. *CD44v(3, 8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells*. *J. Cell. Physiol.*, 176:206-15.
- Buletic Z., Soprano K.J. et Soprano D.R. 2006. *Retinoid targets for the treatment of cancer*. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 3:193-210.

Buto S., Tagliabue E., Ardini E., Magnifica A., Ghirelli C., van den Brule F., Castronovo V., Colnaghi M.I., Sobel M.E. et Menard S. 1998. *Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor*. J. Cell. Biochem., 3:244-51.

Carmeliet P. 2000. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat. Med., 6:389-95.

Carmeliet P. 2003. *Angiogenesis in health and in disease*. Nat. Med., 6:653-60.

Carmeliet P. 2005. *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 7070:932-6.

Carmeliet P. et Jain R.K. 2000. *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 6801:249-57.

Canadian Cancer Statistics 2006. *Canadian Cancer Society/ National Cancer Institute of Canada/ Statistics Canada/ Public Health Agency of Canada*. Toronto, Canada.

Carbone A., Gloghini A., Colombatti A., Castronovo V. et Menard S. 1995. *Expression of the monomeric 67-kd laminin-binding protein in human lymphomas as defined by MLC5 monoclonal antibody and paraffin section immunohistochemistry*. Hum. Pathol., 5:541-6.

Cha H.J., Park M.T., Chung H.Y., Kim N.D., Sato H., Seiki M. et Kim K.W. 1998. *Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells*. Oncogene, 16:771-8.

Chakrabarti S. et Patel K.D. 2005. *Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils*. J. Leukoc. Biol., 1:279-88.

Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A. et Chakraborti T. 2003. *Regulation of matrix metalloproteinases : an overview*. Mol. Cell. Biochem., 1-2:269-85.

Chantrain C.F., Henriot P., Jodele S., Emonard H., Feron O., Courtoy P.J., DeClerck Y.A. et Marbaix E. 2006. *Mechanisms of pericytes recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases*. Eur. J. Cancer, 3:310-8.

Chao C.F., Chiou S.T., Jeng H. et Chang W.C. 1996. *The porcine sperm motility inhibitor is identical to beta-microseminoprotein and is a competitive inhibitor of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 218:623-8.

Chen C.Y. et Shyu A.B. 1995. *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem. Sci., 20:465-70.

Chirco R., Liu X.W., Jung K.K. et Kim H.R. 2006. *Novel functions of TIMPs in cell signaling*. Cancer Metastasis Rev., 25:99-113.

Chow H.H., Cai Y., Alberts D.S., Hakim I., Dorr R., Shahi F., Crowell J.A., Yang C.S. et Hara Y. 2001. *Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose*

*administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10:53-8.

Chow H.H., Hawik I.A., Vining D.R., Crowell J.A., Ranger-Moore J., Chew W.N., Celaya C.A., Rodney S.R., Hara Y. et Alberts D.S. 2005. *Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals.* Clin. Cancer Res., 11:4627-33.

Chung F.L., Schwartz J., Herzog C.R. et Yang Y.M. 2003. *Tea and cancer prevention: studies in animals and humans.* J. Nutr., 133: 3268S-3274S.

Chyu K.Y., Babbidge S.M., Zhao X., Dandillaya R., Rietveld A.G., Yano J., Dimayuga P., Cercek B. et Shah P.K. 2004. *Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus establish atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice.* Circulation, 109:2448-53.

Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E. et Gallo R.C. 1978. *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75:2458-2462.

Colognato H. et Yurchenco P.D. 2000. *Form and function: the laminin family of heterotrimers.* Dev. Dyn., 2:213-34.

Compagni A. et Christofori G. 2000. *Recent advances in research on multistage tumorigenesis.* Br. J. Cancer, 1:1-5.

Cooper R., Morre D.J. et Morre D.M. 2005a. *Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits.* J. Altern. Complement. Med., 11:521-8.

Cooper R., Morre D.J. et Morre D.M. 2005b. *Medicinal benefits of green tea: Part II. Review of anticancer properties.* J. Altern. Complement. Med., 11:521-8.

Corcoran M.L., Kibbey M.C., Kleinman H.K. et Wahl L.M. 1995. *Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases.* J. Biol. Chem., 270:10365-8.

Corda S., Samuel J.L. et Rappaport L. 2000. *Extracellular matrix and growth factors during heart growth.* Heart fail. Rev., 2:119-30.

Coussens L.M. et Werb Z. 2002. *Inflammation and cancer.* Nature, 420:860-867.

Cowland J.B. et Borregaard N. 1999. *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules.* J. Leukoc. Biol., 6:989-95.

D'Alessandro T., Prasain J., Benton M.R., Botting N., Moore R., Darley-USmar V., Patel R. et Barnes S. 2003. *Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils*. J. Nutr., 133:3773S-3777S.

Danielpour D. 2005. *Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate*. Eur. J. Cancer, 41:846-57.

Datta K., Mondal S., Sinha S., Li J., Wang E., Knebelmann B., Karumanchi S.A. et Mukhopadhyay D. 2005. *Role of elongin-binding domain of von Hippel Lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma*. Oncogene, 24:7850-8.

Davis G.E. et Senger D.R. 2005. *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. Circ. Res., 11:1093-107.

Dean J.L., Wait R., Mahtani K.R., Sully G., Clark A.R. et Saklatvala J. 2001. *The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR*. Mol. Cell Biol., 21:721-30.

Degos F. 2006. *Vaccination against hepatitis B virus*. Presse Med., 2 Pt 2: 347-52.

Dell'Aica I., Dona M., Sartor L., Pezzato E. et Garbisa S. 2002. *(-)-Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface*. Lab. Invest., 82:1685-93.

Demeule M., Brossard M., Page M., Gingras D. et Béliveau R. 2000. *Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins*. Biochim. Biophys. Acta., 1478:51-60.

Demeule M., Michaud-Levesque J., Annabi B., Gingras D., Boivin D., Jodoin J., Lamy S., Bertrand Y. et Béliveau R. 2002. *Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds*. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, 2:441-463.

Dennis M.S., Zhang M., Meng Y.G., Kadkhodayan M., Kirchhofer D., Combs D. et Damico L.A. 2002. *Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins*. J. Biol. Chem., 277:35035-43.

Deryugina E.I. et Quigley J.P. 2006. *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev., 25:9-34.

Di Paolo A. et Bocci G. 2007. *Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification*. Curr. Oncol.Rep., 2:109-14.

Divisi D., Di Tommaso S., Salvemini S., Garramone M. et Crisci R., 2006. *Diet and cancer*. Acta. Biomed., 2:118-23.

Dona M., Dell'Aica I., Calabrese F., Benelli R., Morini M., Albini A. et Garbisa S. 2003. *Neutrophil restraint by green tea : inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmanary fibrosis*. J. Immunol., 170:4335-41.

Donaldson E.A., McKenna D.J., McMullen C.B., Scott W.N., Stitt A.W. et Nelson J. 2000. *The expression of membrane-associated 67-kDa laminin receptor (67LR) is modulated in vitro by cell-contact inhibition*. Mol. Cell. Biol. Res. Commun., 3:53-9.

Donaldson M.S. 2004. *Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet*. Nutr. J., 3:19-39.

Dong Z., Nemeth J.A., Cher M.L., Palmer K.C., Bright R.C. et Fridman R. 2001. *Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloprotinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells*. Int. J. Cancer, 93:507-15.

Eble J.A. et Haier J. 2006. *Integrins in cancer treatment*. Curr. Cancer Drug Targets, 2:89-105.

Eliceiri B.P. 2001. *Integrin and growth factor receptor crosstalk*. Circ. Res., 12:1104-10.

Engbring J.A. et Kleinman H.K. 2003. *The basement membrane matrix in malignancy*. J. Pathol., 200:465-70.

Fan X.C. et Steitz J.A. 1998. *Overexpression of HuR, a nuclear-shuttling protein; increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs*. EMBO J., 17:3448-60.

Fassina G., Vene R., Morini M., Minghelli S., Benelli R., Noonan D.M., Albini A. 2004. *Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate*. Clin. Cancer Res., 10:4865-73.

Fidler I.J. 1995. *Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis*. J. Natl. Cancer Inst., 87:1588-1592.

Forget M.A., Desrosiers R.R. et Beliveau R., 1999. *Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 7:465-80.

Freitas V.M., Scheremeta B., Hoffman M.P. et Jaeger R.G. 2004. *Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line*. Oral Oncol., 40:483-9.

Fuchs M., Diehl V. et Re D. 2006. *Current strategies and new approches in the treatment of Hodgkins's lymphoma*. Pathobiology, 3:126-40.

Gallouzi I.E., Brennan C.M., Stenberg M.G., Swanson M.S., Eversole A., Maizels N. et Steitz J.A. 2000. *HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97:3073-8.

Gallouzi I.E. et Steitz J.A. 2001. *Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides*. Science, 294: 1895-901.

Gallus, Bosetti C. et La Vecchia C. 2004. *Mediterranean diet and cancer risk*. Eur. J. Cancer Pre., 5:447-52.

Garde S.V., Basrur V.S., Li L., Finkelman M.A., Krishan A., Wellham L., Ben-Jose E., Haddad M., Taylor J.D., Porter A.T. et Tang D.G. 1999. *Prostate secretory protein (PSP(4) suppresses the growth of androgen-independent prostate cancer cell line (PC2) and xenografts by inducing apoptosis*. Prostate, 38:118-25.

Garde S., Shukeir N., Arakelian A., Chen G., Morin C., Forté A., et al. 2005. *Inhibition of angiogenesis and MMP-9 production by a synthetic peptide (PCK3145) in a syngeneic model of rat prostate cancer results in decreased tumor growth and skeletal metastasis in vitro and in vivo*. AACR Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).

Garg A.K., Buchholz T.A. et Aggarwal B.B. 2005. *Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols*. Antioxid. Redox. Signal., 7:1630-1647.

Gauczynski S., Hundt C., Leucht C. et Weiss S. 2001. *Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules*. Adv. Protein Chem., 57:229-272.

Gauczynski S., Peyrin J.M., Haik S., Leucht C., Hundt C., Rieger R., Krasemann S., Deslys J.P., Dormont D., Lasmezas C.I. et Weiss S. 2001. *The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein*. Embo. J., 20:5863-5875.

Gidday J.M., Gasche Y.G., Copin J.C., Shah A.R., Perez R.S., Shapiro S.D., Chan P.H. et Park T.S. 2005. *Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 289:H558-H568.

Gingerich T.J., Feige J.J. et LaMarre J. 2004. *AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability*. Anim. Health Res. Rev., 1:49-63.

Gittoes N.J. 2003. *Radiotherapy for non-functioning pituitary tumors—when and under wath circumstances?* Pituiyary, 2:103-8.

Givant-Horwitz V., Davidson B. et Reich R. 2004. *Laminin-induced signalling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor*. Cancer Res., 64:3572-9.

Givant-Horwitz V., Davidson B. et Reich R. 2005. *Laminin-induced signaling in tumor cells*. Cancer Lett., 223:1-10.

Givant-Horwitz V., Davidson B., van de Putte G., Dong H.P., Goldberg I., Amir S., Kristensen G.B. et Reich R. 2003. *Expression of the 67 kDa laminin receptor and the alpha6 integrin subunit in serous ovarian carcinoma*. Clin. Exp. Metastasis, 7:599-609.

Gohji K., Fujimoto N., Hara I., Fujii A., Gotoh A., Okada H., Arakawa S., Kitazawa S., Miyake H., Kamidono S. et Nakajima M. 1998. *Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension*. Int. J. Cancer, 79:96-101.

Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H. et Thorgerirsson U.P. 1997. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur. J. Cell. Biol., 2:111-22.

Gondi C.S., Lakka S.S., Dinh D.H., Olivero W.C., Gujrati M et Rao J.S. 2004. *Downregulation of uPA: uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (saRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth*. Neuron. Glia. Biol., 2:165-176.

Gonzalez C.A. 2006. *Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence*. Br.J. Nutr., 1:S42-5.

Goodin S., Rao K.V. et DiPaola R.S. 2002. *State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer*. Oncologist., 7:360-370.

Griffin J., Munroe D., Major P. et Kufe D. 1982. *Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis*. Exp. Hematol., 10:774-781.

Guhaniyogi J. et Brewer G. 2001. *Regulation of mRNA stability in mammalian cells*. Gene, 1-2:11-23.

Gupta G.P. et Massaque J. 2006. *Cancer metastasis : building a framework*. Cell., 4:679-95.

Gupta K. et Zhang J. 2005. *Angiogenesis : a curse or cure?* Postgrad. Med. J., 954:236-42.

Guo W. et Giancotti F.G. 2004. *Integrin signalling during tumour progression*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 10:816-26.

Hahn-Dantona E., Ruiz J.F., Bornstein P. et Strickland D.K. 2001. *The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediated its catabolism*. J. Biol. Chem., 276:15498-503.

Halatsch M.E., Hirsch-Ernst K.I., Kahl G.F. et Weinell R.J. 1997. *Increased expression of alpha6-integrin receptors and of mRNA encoding the putative 37 kDa laminin receptor precursor in pancreatic carcinoma*. Cancer lett., 118:7-11.

Han C. 1997. *Screening of antiangiogenic ingredients in tea polyphenols*. Cancer Lett., 114:153-8.



- Han Y.P., Tuan T.L., Hughes M., Wu H. et Garner W.L. 2001. *Transforming growth factor-beta – and tumor necrosis factor-alpha –mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin.* J. Bio. Chem., 25:22341-50.
- Harris J.M., Martin N.E. et Modi M. 2001. *Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics.* Clin. Pharmacokinet., 40: 539-51.
- Haubner R., Wester H.J., Burkhart F., Senekowitsch-Schmidke R., Weber W., Goodman S.L., Kessler H. et Schwaiger M. 2001. *Glycosylated RGD-containing peptides: a tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics.* J. Nucl. Med., 42:326-36
- Hawkins R.E., Daigneault L., Cowan R., Griffiths R., Panchal C., Armstrong .A, Fenemore J., Irvine A., Sereda K. et Dulude H. 2005. *Safety and tolerability of PCK3145, a synthetic peptide derived from prostate secretory protein 94 (PSP94) in metastatic hormone-refractory prostate cancer.* Clin. Prostate Cancer, 4:91-9.
- Heidinger M., Kolb H., Krell H.W., Jochum M. et Ries C. 2006. *Modulation of autocrine TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells.* Biol. Chem., 387:69-78.
- Herz J. et Strickland D.K. 2001. *LRP:a multifunctional scavenger and signaling receptor.* J. Clin. Invest., 108:779-84.
- Hickley M.M. et Simon M.C. 2006. *Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors.* Curr. Top. Dev. Biol., 76:217-57.
- Higdon M.L. et Higdon J.A. 2006. *Treatment of oncologic emergencies.* Am. Fam. Physician, 11:1873-80.
- Hirano M., Kamada M., Maeda N., Yamamoto S., Aono T. et Koide S.S. 1996. *Presence of immunoglobulin binding factor on human sperm surface as sperm coating antigen.* Arch. Androl., 37:163-70.
- Hirschi K.K., Rohovsky S.A. et D'Amore P.A. 1998. *PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate.* J.Cell. Biol., 141:805-14.
- Holmbeck K., Bianco P., Yamada S. et Birkedal-Hansen H. 2004. *MT1-MMP: a tethered collagenase.* J. Cell. Physiol., 200:11-9.
- Hoon D.S., Kitago M., Kim J., Mori T., Piris A., Szyfelbein K., Mihm M.C. Jr, Nathanson S.D., Padera T.P., Chambers A.F., Vantyghm S.A., et al. 2006. *Molecular mechanisms of metastasis.* Cancer Metastasis Rev., 2:203-30.

- Hu Y. et Ivashkiv L.B. 2006. *Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN-alpha dendritic cells*. J. Immunol., 176:6022-33.
- Huberman E. et Callahan M.F. 1979. *Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:1293-1297.
- Huhtala P., Tuuttila A., Chow L.T., Lohi J., Keski-Oja J. et Tryggvason K. 1991. *Complete structure of human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells*. J. Biol. Chem., 266:16485-90.
- Hunter K.W. 2004. *Host genetics and tumour metastasis*. Br. J. Cancer, 90:4752-5.
- Huwyler A., Akool el-S., Aschrafi A., Hamada F.M., Pfeilschifter J. et Eberhardt W. 2003. *ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR*. J. Biol. Chem., 278:51758-69.
- Hymel P.A. 2006. *Decreasing risk: impact of HPV vaccination on outcomes*. Am. J. Manag. Care, 12: S473-83.
- Isacke C.M. et Yarwood H. 2002. *The hyaluronan receptor, CD44*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 34:718-21.
- Isisag A., Nese N., Ermete M., Lekili M., Ayhan S. et Kandiloglu A.R. 2003. *Col IV and Fn distribution in prostatic adenocarcinoma and correlation of 67LR, MMP-9 and TIMP-1 expression with Gleason score*. Anal. Quant. Cytol. Histol., 25:263-272.
- Iyer V., Pumiglia K. et DiPersio C.M. 2005. *Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression*. J. Cell. Sci., 118:1185-1195.
- Jadhav U., Chigurupati S., Lakka S.S. et Mohanam S. 2004. *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells*. Int. J. Oncol., 25:1407-14.
- Jain R.K. 2002. *Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor*. Semin. Oncol., 29 Suppl. 16: 3-9.
- Jin H. et Varner J. 2004. *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br. J. Cancer, 90:561-5.
- Jodoin J., Demeule M. et Béliveau R. 2002. *Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols*. Biochim. Biophys. Acta., 1542:149-159.
- Johansson N., Ahonen M et Kahari V.M. 2000. *Matrix metalloproteinases in tumor invasion*. Cell. Mol. Life Sci., 57:5-15.

- Jothy S. 2003. *CD44 and its partners in metastasis*. Clin. Exp. Metastasis, 3:195-201.
- Kajita M., Itoh Y., Chiba T., Mori H., Okada A., Kinoh H. et Seiki M. 2001. *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration*. J. Cell. Biol., 5:893-904.
- Kamangar F., Dores G.M. et Anderson W.F. 2006. *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J. Clin. Oncol., 14:2137-50.
- Khan K.M. et Falcone D.J. 1997. *Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression*. J. Biol. Chem., 272:8270-5.
- Khan N., Afaq F., Saleem M., Ahmad N. et Mukhtar H. 2006. *Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Cancer Res., 66:2500-2505.
- Kim K.J., Chung J.W. et Kim K.S. 2005. *67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing Escherichia coli K1 into human brain microvascular endothelial cells*. J. Biol. Chem., 280:1360-1368.
- Kim H.S., Kim M.H., Jeong M., Hwang Y.S., Lim S.H., Shin B.A., Ahn B.W. et Jung Y.D. 2004. *EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells*. Anticancer Res., 24:747-753.
- Klaunig J.E. et Kamendulis L.M. 2004. *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 44:239-67.
- Klein G., Vellenga E., Fraaije M.W., Kamps W.A. et de Bont E.S. 2004. *The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2:87-100.
- Kopfstein L. et Christofori G. 2006. *Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment*. Cell. Mol. Life Sci., 4:449-68.
- Kreutzer J. et Fahlbusch R. 2004. *Diagnosis and treatment of pituitary tumors*. Curr. Opin. Neurol., 6:693-703.
- Kucharewicz I., Kowal K., Buczo W. et Bodzenta-Lukaszyk A. 2003. *The plasmin system in airway remodelling*. Thromb. Res., 112:1-7.
- Lal A., Mazan-Mamczarz K., Kawai T., Yang X., Martindale J.P. et Gorospe M. 2004. *Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs*. EMBO. J., 23:3092-102.
- Lambert E., Dasse E., Haye B et Petitfrere E. 2004. *TIMPs as multifacial proteins*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 49:187-98.

Lamy S., Gingras D. et Béliveau R. 2002. *Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation*. *Cancer Res.*, 62:381-385.

Lamy S., Ruiz M.T., Wisniewski J., Garde S., Rabbani S.A., Panchal C., Wu J.J. et Annabi B. 2006. *A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis*. *Int. J. Cancer.*, 118:2350-2358.

Langlois S., Gingras D. et Béliveau R. 2004. *Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation*. *Blood*, 8:3020-8.

Larson R.A., Daley G.Q., Schiffer C.A., Porcu P., Pui C.H., Marie J.P., Steelman L.S., Bertrand F.E. et McCubrey J.A. 2003. *Treatment by design in leukemia, a meeting report, Philadelphia, Pennsylvania, December 2002*. *Leukemia*, 17:2358-2382.

Lemaître V. et D'Armiento J. 2006. *Matrix metalloproteinases in development and disease*. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today*, 78:1-10.

Lemarie E. 2004. *Malignant germinal tumours of the mediastinum: diagnosis and treatment*. *Rev. Pneumol. Clin.*, 60:3S79-85.

Levy A.P. 1998. *Hypoxic regulation of VEGF mRNA-binding proteins*. *Trends Cardiovasc. Med.*, 6:246-50.

Levy N.S., Chung S., Furneaux H. et Levy A.P. 1998. *Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR*. *J. Biol. Chem.*, 273:6417-6423.

Lewis C.E. et Pollard J.W. 2006. *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. *Cancer Res.*, 66:605-12.

Liekens S., De Clercq E. et Neyts J. 2001. *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. *Biochem. Pharmacol.*, 3:253-70.

Lien S. et Lowman H.B. 2003. *Therapeutic peptides*. *Trends Biothechnol.*, 21:556-62.

Lill G., Voit S., Schror K. et Weber A.A. 2003. *Complex effects of different green tea catechins on human platelets*. *FEBS Lett.*, 546:265-270.

Lokeshwar B.L. 1999. *MMP inhibition in prostate cancer*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 878:271-289.

Lopez de Silanes I., Fan J., Galban C.J., Spencer R.G., Becker K.G. et Gorospe M. 2004. *Global analysis of HuR-regulated gene expression in colon cancer systems of reducing complexity*. *Gene Expr.*, 12:49-59.

- Lopez de Silanes I., Lal A. et Gorospe M. 2005. *HuR: post-transcriptional paths to malignancy*. RNA Biol., 2:11-3.
- Ma W.J., Cheng S., Campbell C., Wright A. et Furneaux H. 1996. *Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein*. J. Biol. Chem., 271:8144-51.
- Malemud C.J. 2006. *Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview*. Front. Biosci., 11:1696-701.
- Mancini A. et Di Battista J.A. 2006. *Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease*. Front. Biosci., 11:423-46.
- Mandal M., Mandal A., Das S., Chakraborti T. et Sajal C. 2003. *Clinical Implications of matrix metalloproteinases*. Mol. Cell. Biochem., 1-2:305-29.
- Mandel S. et Youdim M.B. 2004. *Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases*. Free Radic. Biol. Med., 37:304-17.
- Massova I., Kotra L.P., Fridman R. et Mobashery S. 1998. *Matrix metalloproteinases: structure, evolution, and diversification*. FASEB J., 12:1075-95.
- McCarron P.A., Olwill S.A., Marouf W.M., Buick R.J., Walker B. et Scott C.J. 2005. *Antobody conjugates and therapeutic strategies*. Mol. Intery., 6:368-80.
- McKenna D.J., Simpson D.A., Feeney S., Gardiner T.A., Boyle C., Nelson J. et Stitt A.W. 2001. *Expression of the 67 kDa laminin receptor (67LR) during retinal development: correlations with angiogenesis*. Exp. Eye Res., 73:81-92.
- McMillan J.I., Weeks R., West J.W., Bursten S., Rice G.C. et Lovett D.H. 1996. *Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion*. Int. J. Cancer, 67:523-531.
- Menard S., Castronovo V., Tagliabue E. et Sobel M.E. 1997. *New insights into the metastasis-associated 67kDa laminin receptor*. J. Cell. Biochem., 2:155-65.
- Menard S., Tagliabue E. et Colnaghi M.I. 1998. *The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer*. Breast Cancer Res. Treat., 52:137-45.
- Minafra S., Giambelluca C., Andriolo M. et Pucci-Minafra I. 1995. *Cell-cell and cell-collagen interactions influence gelatinase production by human breast-carcinoma cell line 8701-BC*. Int. J. Cancer, 62:777-83.
- Moehler T.M., Hillengass J., Goldschmidt H. et Ho A.D. 2004. *Antiangiogenic therapy in hematologic malignancies*. Curr. Pharm. Des., 10:1221-1234.

- Montuori N., Selleri C., Risitano A.M., Raiola A.M., Ragno P., Del Vecchio L., Rotoli B. et Rossi G. 1999. *Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation.* Clin. Cancer Res., 5:1465-1472.
- Moses M.A., Wiederschain D., Loughlin K.R., Zurakowski D., Lamb C.C. et Freeman M.R. 1998. *Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients.* Cancer Res., 58:1395-1399.
- Morel E., Andrieu T., Casagrande F., Gauczynski S., Weiss S., Grassi J., Rousset M., Dormont D. et Chambaz J. 2005. *Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor.* Am. J. Pathol., 167:1033-42.
- Mott J.D. et Werb Z. 2004. *Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases.* Curr. Opin. Cell. Biol., 5:558-64.
- Mueller M.M. et Fusenig N.E. 2004. *Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer.* Nat. Rev. Cancer, 11:839-49.
- Munaut C., Noel A., Weidle U.H., Krell H.W. et Foidart J.M. 1995. *Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT-1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts.* Invasion Metastasis, 15:169-78.
- Mundle S.D. et Sheth N.A. 1991. *In vivo suppression of pituitary and circulatory follicle stimulating hormone by human seminal plasma inhibin.* Indian J. Exp. Biol., 29:310-4.
- Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S et Garvrilovic J. 1999. *Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation.* APMIS, 107:38-44.
- Nagano O. et Saya H. 2004. *Mechanism and biological significance of CD44 cleavage.* Cancer Sci., 12:930-5.
- Nagase H., Visse R. et Murphy G. 2006. *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* Cardiovasc. Res., 3:562-73.
- Na H.K. et Surh Y.J. 2006. *Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate.* Mol. Nutr. Food Res., 50:152-159.
- Nair R.R. et Boyd D.D. 2005. *Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression.* Biochem. Soc. Trans., 33:1135-1136.
- Nakahara H., Nomizu M., Akiyama S.K., Yeh Y. et Chen W.T. 1996. *A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin Gpeptides.* J. Biol. Chem., 271:27221-4.
- Nance C.L. et Shearer W.T. 2003. *Is green tea good for HIV-1 infection?* J. Allergy Clin. Immunol., 112:851-3.

Narumi K., Inoue A., Tanaka M., Isemura M., Shimo-Oka T., Abe T., Nukiwa T. et Satoh K. 1999. *Inhibition of experimental metastasis of human fibrosarcoma cells by anti-recombinant 37-kDa laminin binding protein antibody*. Jpn. J. Cancer Res., 90:425-31.

Naumov G.N., Akslen L.A. et Folkman J. 2006. *Role of angiogenesis in human tumor dormancy : animal models of angiogenic switch*. Cell Cycle, 16:1779-87.

Nemeth J.A., Yousif R., Herzog M., Che M., Upadhyay J., Shekariz B., Bhagat S., Mullins C., Fridman R. et Cher M.L. 2002. *Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis*. J. Natl. Cancer Inst. 94:17-25.

Oak M.H., El Bedoui J. et Schini-Kerth V.B. 2005. *Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea*. J. Nutr. Biochem., 16:1-8.

Oh J., Takahashi R., Kondo S., Mizoguchi A., Adachi E., Sasahara R.M., Nihimura S., Imamura Y., Kitayama H., Alexander D.B., Ide C., Horan T.P. et al. 2001. *The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis*. Cell, 107:789-800.

Okegawa T., Pong R.C., Li Y. et Hsieh J.T. 2004. *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy*. Acta. Biochim. Pol., 2:445-57.

Olson M.W., Gervasi D.C., Mobashery S. et Fridman R. 1997. *Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2*. J. Biol. Chem., 47:29975-83.

Olson M.W., Toth M., Gervasi D.C., Sado Y., Ninomiya Y. et Fridman R. 1998. *High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV*. J. Biol. Chem., 273:10672-81.

Omuro A.M. et Abrey L.E. 2006. *Chemotherapy for primary central nervous system lymphoma*. Neurosurg. Focus, 5:E12.

Opdenakker G., Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Masure S., Proost P. et Van Damme J. 2001. *Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology*. J. Leukoc. Biol., 6:851-9.

Overall C.M. et Kleinfeld O. 2006. *Tumour microenvironment – opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy*. Nat. Rev. Cancer, 6:227-39.

Ozaki I., Yamamoto K., Mizuta T., Kajihara S., Fukushima N., Setoguchi Y., Morito F. et Sakai T. 1998. *Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma*. Gut., 43:837-42.

Parkin D.M. 2004. *International variation*. Oncogene, 38:6329-40.



- Parmiani G., Castelli C., Santinami M. et Rivoltini L. 2007. *Melanoma immunology : past, present and future*. Curr. Opin. Oncol., 2:121-7.
- Partridge C.A., Phillips P.G., Niedbala M.J. et Jeffrey J.J. 1997. *Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts*. Am. J. Physiol., 272:L813-22.
- Patarroyo M., Tryggvason K. et Virtanen I. 2002. *Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis*. Semin. Cancer Biol., 3:197-207.
- Pavlaki M., Cao J., Hymowitz M., Chen W.T., Bahou W. et Zucker S. 2002. *A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone*. J. Biol. Chem., 4:2740-9.
- Pearson H.A. 2002. *History of pediatric haematology oncology*. Pediatr. Res., 52:979-92.
- Pellegrini R., Martignone S., Menard S. et Colnaghi M.I. 1994. *Laminin receptor expression and function in small-cell lung carcinoma*. Int. J. Cancer Suppl., 8:116-20.
- Perez-Thomas R. 2006. *Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment*. Curr. Med. Chem., 16:1859-76.
- Pfeffer U., Ferrari N., Morini M., Benelli R., Noonan D.M. et Albin A. 2003. *Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs*. Int. J. Biol. Markers, 18:70-4.
- Plant N.J., Ogg M., Crowder M. et Gibson G.G. 2000. *Control and statistical analysis of in vitro reporter gene assays*. Analytical Biochemistry, 278:170-4.
- Rajadining J., Bord E., Luedemann C., Asai J., Hamada H., Thorne T., Qin G., Goukassian D., Zhu Y., Losordo D.W. et Kishore R. 2006. *IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression*. FASEB J., 20:2112-4.
- Rak J. et Yu J.L. 2004. *Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"*. Semin. Cancer Biol., 2:93-104.
- Ria R., Loverro G., Vacca A., Ribatti D., Cormio G., Roccaro A.M. et Selvaggi L. 2002. *Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas*. Eur. J. Clin. Invest., 3:199-206.
- Ribatti D., Scavelli C., Roccaro A.M., Crivellato E., Nic B. et Vacca A. 2004. *Hematopoietic cancer and angiogenesis*. Stem Cells Dev., 13:484-495.
- Rigot V., Lehmann M., Andre F., Daemi N., Marvaldi J. et Luis J. 1998. *Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells*. J. Cell Sci., 111:3119-27.

Rollins B.J. 2006. *Inflammatory chemokines in cancer growth and progression*. Eur. J. Cancer, 6:760-7.

Rosenfeldt M.T., Valentino M., Labruzzo S., Scudder L., Pavlaki M., Cao J., Vacirca J. Bahou W.F. et Zucker S. 2005. *The organomercurial 4-aminophenylmercuric acetate independent of matrix metalloproteinases, induces dose-dependent activation/inhibition of platelet aggregation*. Thromb. Haemost., 2:326-30.

Sakai H., Tsurusaki T., Kanda S., Koji T., Xuan J.W. et Saito Y. 1999. *Prognostic significance of  $\beta$ -microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer*. Prostate, 38:278-84.

Sang Q.X., Birkedal-Hansen H. et Van Mart H.E. 1995. *Proteolytic activation of human neutrophil procollagenase B*. Biochim. Biophys. Acta., 2:99-108.

Schally A.V. et Nagy A. 1999. *Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugate to their receptors on tumors*. Eur. J. Endocrinol., 141:1-14.

Schneider W.J. et Nimpf J. 2003. *LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling*. Cell. Mol. Life Sci., 5:892-903.

Schroen D.J. et Brinckerhoff C.E. 1996. *Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms*. Gene Expr., 4:197-207.

Sheflin L.G., Zou A.P. et Spaulding S.W. 2004. *Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1 $\alpha$  and EGF mRNA*. Biochem Biophys. Res. Commun., 322:644-651.

Shukeir N., Arakelian A., Chen G., Garde S., Ruiz M., Panchal C. et Rabbani S.A. 2004. *A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia*. Cancer Res., 64:5370-7.

Shukeir N., Arakelian A., Kadhim S., Garde S., Rabbani S.A. 2003. *Prostate secretory protein PSP94 decreases tumor growth and hypercalcemia of malignancy in a syngenic in vivo model of prostate cancer*. Cancer Res., 63:2072-8.

Shukeir N., Garde S., Wu J.J., Panchal C. et Rabbani S.A. 2005. *Prostate secretory protein of 94 amino acids (PSP-94) and its peptide (PCK3145) as potential therapeutic modalities for prostate cancer*. Anticancer Drugs, 16:1045-51.

Silver F.H. et Trelstad R.L. 1980. *Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments*. J. Biol. Chem., 255:9427-33.

- Simizu S., Takagi S., Tamura Y. et Osada H. 2005. *RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines*. *Cancer Res.*, 16:7455-61.
- Simon P. et Dupond I. 2006. *Anti-HPV vaccination: preventing cervical cancer*. *Rev. Med. Brux.*, 4:S338-40.
- Skubitz A.P. 2002. *Adhesion Molecules*. *Cancer treat. Res.*, 107: 305-29.
- Sridhar S.S. et Shepherd F.A. 2003. *Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer*. *Lung cancer*, 42:S81-91.
- Stamenkovic I. 2000. *Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. *Semin. Cancer Biol.*, 6:415-33.
- Stampfuss J.J., Schror K. et Weber A.A. 2005. *Green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position inhibit tissue factor-induced thrombin generation*. *Thromb. Haemost.*, 93:1200-1201.
- Stapleton P.D., Shah S., Hamilton-Miller J.M., Hara Y., Nagaoka Y., Kumagai A., Uesato S, et Taylor P.W. *Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24:374-80.
- Stawowy P., Meyborg H., Stibenz D., Borges Pereira Stawowy N., Roser M., Thanabalasingam U., Veinot J.P., Chretien M., Seidah N.G. et Graf K. 2005. *Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis*. *Circulation*, 21:2820-7.
- St-Pierre Y., Van Themsche C. et Esteve P.O. 2003. *Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies*. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2:206-215.
- Stickland D.K. et Medved L. 2006. *Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-mediated clearance of activated blood coagulation co-factors and proteases: clearance mechanism or regulation?* *J. Thromb. Haemost.*, 7:1484-6.
- Stupack D.G. 2005. *Integrins as a distinct subtype of dependence receptors*. *Cell. Death Diff.*, 8:1021-30.
- Sung H.J., Johnson C.E., Lessner S.M., Magid R., Drury D.N. et Galis Z.S. 2005. *Matrix metalloproteinase 9 facilitates collagen remodeling and angiogenesis for vascular constructs*. *Tissue Eng.*, 1-2:267-76.
- Surh Y. 1999. *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances*. *Mutat. Res.*, 428:305-327.

Tachibana H., Koga K., Fujimura Y. et Yamada K. 2004. *A receptor for green tea polyphenol EGCG*. Nat. Struct Mol. Biol., 11:380-381.

Taipale J. et Keski-Oja J. 1997. *Growth factors in the extracellular matrix*. FASEB J., 1:51-9.

Takahashi C., Sheng Z., Horan T.P., Kitayama H., Maki M., Hitomi K., Kitaura Y., Takai S., Sasahara R.M., Horimoto A., Ikawa Y., Ratzkin B.J., Arakawa T. et Noda M. 1998. *Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 22:13221-6.

Takahashi K., Eto H. et Tanabe K.K. 1999. *Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells*. Int. J. Cancer, 3:387-95.

Thomas D.A., Giles F.J., Cortes J., Albitar M. et Kantarjian H.M. 2001. *Antiangiogenic therapy in leukemia*. Acta. Haematol., 106:190-207.

Thomasset S.C., Berry D.P., Garcea G., Marcylo T., Steward W.P. et Gescher A.J. 2006. *Dietary polyphenolic phytochemicals-promising cancer chemoprevention agents in humans ? A review of their clinical properties*. Int. J. Cancer, Epub ahead of print.

Tonetti D.A., Henning-Chubb C., Yamanishi D.T. et Huberman E. 1994. *Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells*. J. Biol. Chem., 269:23230-23235.

Tonini T., Rossi F. et Claudio P.P. 2003. *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. 42:6549-56.

Tsang K.J. et Crowe D.L. 2001. *Retinoic acid and extracellular matrix metalloproteinase 9 expression is mediated by the mitogen activated protein kinase pathway*. Int. J. Oncol., 18:369-74.

Tsurusaki T., Koji T., Sakai H., Kanetake H., Nakane P.K. et Saito Y. 1998. *Cellular expression of beta-microseminoprotein (beta-MSP) mRNA and its protein in untreated prostate cancer*. Prostate, 35:109-16.

Tsuzuki S., Kitajima K., Nakano T., Glasow A., Zelent A. et Enver T. 2004. *Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2*. Mol. Cell. Biol., 24:6824-6836.

Turcotte S., Desrosiers R.R. et Béliveau R. 2003. *HIH-1 alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma*. J. Cell. Sci., 116:2247-60.

Turcotte S., Desrosiers R.R. et Béliveau R. 2004. *Hypoxia upregulates von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein through RhoA-dependent activity in renal cell carcinoma*. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2:F338-48.

- Ueda Y., Imai K., Tsuchita H., Fujimoto N., Nakanishi I., Katsuda S., Seiki M. et Okada Y. 1996. *Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumour of bone and is associated with vascular invasion*. Am. J. Pathol., 2:611-22.
- Vacca A., Ria R., Presta M., Ribatti D., Iurlaro M., Merchionne F., Tanghetti E. et Dammacco F. 2001. *Alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells*. Exp. Hematol., 29:993-1003.
- Vadillo-Ortega F., Hernandez A., Gonzalez-Avila G., Bermejo L., Iwata K. et Strauss J.F. 3<sup>rd</sup>. 1996. *Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes*. Am. J. Obstet. Gynecol., 4:1371-6.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. 2006. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem. Biol. Interact., 1:1-40.
- Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Raymond A.D. et Opdenakker G. 2002. *Biochemistry and Molecular Biologie of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 37:375-536.
- Van den Steen P.E., Van Aelst I., Hvidberg V., Piccard H., Fiten P., Jacobsen C., Moestrup S.K., Fry S., Royle L., et al. 2006. *The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinases B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors*. J. Biol. Chem., 27:18626-37.
- Van Hinsbergh V.W., Engelse M.A. et Quax P.H. 2006. *Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 4:716-28.
- VanSaun M.N et Matrisian L.M. 2006. *Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease*. Birth Defects Res. C. Embryo. Today, 1:68-79.
- Van Wart H.E. et Birkedal-Hansen H. 1990. *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14:5578-82.
- Vihinen P. et Kahari V.M. 2002. *Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets*. Int. J. Cancer, 99:157-66.
- Vihinen P., Ala-aho R. et Kahari V.M. 2005. *Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer*. Curr. Cancer Drug Targets, 5:203-20.
- Wahl S.M., Allen J.B., Weeks B.S., Wong H.L. et Klotman P.E. 1993. *Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:4577-81.

- Waltregny D., de Leval L., Coppens L., Youssef E., de Leval J. et Castronovo V. 2001. *Detection of the 67-kD laminin receptor in prostate cancer biopsies as a predictor of recurrence after radical prostatectomy*. Eur. Urol., 40:495-503.
- Wang D., Anderson J.C. et Gladson C.L. 2005. *The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors*. Brain Pathol., 4:318-26.
- Wang J.M., Hishinuma A., Oppenheim J.J. et Matsushima K. 1993. *Studies of binding and internalization of human recombinant monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by monocytic cells*. Cytokine, 5:264-75.
- Weaver V.M. 2002. *Membrane-associated MMP regulators: novel cell adhesion tumor suppressor proteins?* Dev. Cell., 2:6-7.
- World Cancer Report. 2003. *International Agency for Research on Cancer*. Éd. Stewart B.W. et Kleihues P., IARC Press Lyon, France.
- Wu L.Y., Juan C.C., Hwang L.S., Hsu Y.P., Ho P.H. et Ho L.T. 2004. *Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model*. Eur. J. Nutr., 43:116-24.
- Xie B., Laouar A. et Huberman E. 1998. *Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor-alpha via alpha5 beta1 integrin in HL-60 cells*. J. Biol. Chem., 273:11583-11588.
- Xie B., Laouar A. et Huberman E. 1998b. *Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta*. J. Biol. Chem., 273:11576-82.
- Xu Y.Z., Di Marco S., Gallouzi I., Rola-Pleszczynski M. et Radzioch D. 2005. *RNA-binding protein HuR is required for stabilization of SLC11A1 mRNA and SLC11A1 protein expression*. Mol. Cell. Biol., 25:8139-8149.
- Yamaguchi H., Wyckoff J. et Condeelis J. 2005. *Cell migration in tumors*. Curr. Opin. Cell. Biol., 5:559-64.
- Yance D.R. Jr et Sagar S.M. 2006. *Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies*. Integr. Cancer Ther., 5:9-29.
- Yang J.P., Finkelman M.A. et Clarke M.W. 1998. *Detection of PSP94 and its specific binding sites in the prostate adenocarcinoma cell line LNCaP*. J. Urol., 160:2240-2244.
- Yang J., Wei D. et Liu J. 2005. *Repressions of MMP-9 expression and NF-kappa B localization are involved in inhibition of lung carcinoma 95-D cell invasion by (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Biomed. Pharmacother., 59:98-103.

Yang T.T. et Koo M.W. 2000. *Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion.* Life Sci., 66:411-23.

Ye S. 2000. *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases.* Matrix Biol., 7:623-9.

Yun J.H., Pang E.K., Kim C.S., Yoo Y.J., Cho K.S., Chai J.K., Kim C.K. et Choi S.H. 2004. *Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts.* J. Periodontal Res., 39:300-307.

Yu O. et Stamenkovic I. 1999. *Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion.* Genes Dev., 1:35-48.

Yu O. et Stamenkovic I. 2000. *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.* Genes Dev., 14:163-76.

Zaveri N.T. 2006. *Green tea and its polyphenolic catechins : medicinal uses in cancer and noncancer applications.* Life Sci., 78:2073-80.

Zhang C., Duan E., Cao Y., Jiang G. et Zeng G. 2000. *Effet of the 32/67 kDa laminin-binding protein antibody on mouse embryo implantation.* J. Reprod. Fertil. 119:137-42.

Zhang P.L., Driscoll D.L., Lee H.K., Nolan C. et Velagapudi S.R. 1999. *Decreased immunoexpression of prostate inhibin peptide in prostatic carcinoma: a study with monoclonal antibody.* Hum. Pathol., 30:168-72.